

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Fyziologie živočichů



**Mgr. Kateřina Zemánková**

Regulace metabolismu triacylglycerolů v cirkulaci v postprandiální fázi

Regulation of triglyceride metabolism in circulation in postprandial phase

Disertační práce

Školitel: RNDr. Jan Kovář, CSc.

Laboratoř pro výzkum aterosklerózy

Institut klinické a experimentální medicíny

Praha, 2017

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12. 06. 2017

.....

Mgr. Kateřina Zemánková

**Prohlášení:**

Jménem všech spoluautorů prohlašuji, že Mgr. Kateřina Zemánková podstatně přispěla ke všem publikacím, jež jsou nedílnou částí této disertační práce. U publikací, kde je první autorkou, se aktivně podílela na přípravě a provedení experimentů, analýze dat, interpretaci výsledků a přípravě manuskriptů.

V Praze, 12. 06. 2017

.....

RNDr. Jan Kovář, CSc., školitel

## **Identifikační záznam**

ZEMÁNKOVÁ, Kateřina. *Regulace metabolismu triacylglycerolů v cirkulaci v postprandiální fázi [Regulation of triglyceride metabolism in circulation in postprandial phase]*. Praha, 2017. 169 stran. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta / Institut klinické a experimentální medicíny, Laboratoř pro výzkum aterosklerózy. Školitel Kovář, Jan.

## Poděkování

Děkuji svému školiteli panu RNDr. Janu Kovářovi, CSc. za odborné vedení mé práce, cenné rady a za čas, který mi věnoval v průběhu celého studia. Děkuji prof. Ing. Rudolfovi Polednemu, CSc. a doc. MUDr. Janu Piřhovi, CSc. za jejich podporu a rady při sepisování této práce a RNDr. Věře Lánské za pomoc při statistickém zpracování údajů. Velké dík patří mým kolegyním Mgr. Markétě Jirátové, Mgr. Soně Čejkové, Mgr. Tereze Blahové, Mgr. Jolaně Mrázkové, Mgr. Romaně Houdkové, Mgr. Romaně Dembovské a Daně Körberové za ochotu kdykoliv pomoci a za příjemnou atmosféru a optimistickou náladu nejen na pracovišti. Rovněž děkuji prof. MUDr. Věře Adámkové, CSc. za poskytnutí prostor pro provádění vyšetření. Děkuji mé nejlepší kamarádce Mgr. Kateřině Rybákové a několika svým dalším přátelům za podporu a upřímný zájem o mé studium, kterého si velmi vážím.

V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu ve studiu, za pochopení, trpělivost a především za láskyplnou péči, kterou mě zahrnují celý život.

*Tato práce byla podpořena grantem č. NT 14027-3/2013 Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví ČR (IGA MZ ČR), a výzkumným záměrem 00023001 (IKEM, Praha, Česká republika) - Institucionální podpora od Ministerstva zdravotnictví ČR.*

## Abstrakt

Zvýšená hladina triacylglycerolů (TG) je v současné době uznávána jako rizikový faktor ischemické choroby srdeční a její snížení je terapeutickým cílem, který vede ke snížení rizika kardiovaskulárních onemocnění. Tradičně je koncentrace TG stanovena nalačno (8–12 hodin po nočním hladovění) a to hlavně proto, že nárůst koncentrace TG po jídle vede k vysokému kolísání hodnot TG. Lidé však stráví větší část dne v postprandiálním stavu a postprandiální hypertriglyceridémie tedy může hrát významnou roli při určování rizika kardiovaskulárního onemocnění. Postprandiální lipémie je zvýšená a prolongovaná u pacientů s ischemickou chorobou srdeční. Data z Copenhagen Heart Study poukazují na to, že koncentrace TG stanovená v průběhu dne („*non-fasting*“ TG) je asociována s rizikem kardiovaskulárních onemocnění více než lačná koncentrace TG. Koncentrace „*non-fasting*“ TG je podstatně ovlivněna individuálními behaviorálními návyky jako je složení stravy a fyzická aktivita jedince. Je otázkou, zda by bylo vhodné identifikovat jedince s vyšším rizikem kardiovaskulárního onemocnění v důsledku zvýšené postprandiální koncentrace TG použitím tukového tolerančního testu analogického ke glukózovému tolerančnímu testu. V roce 2010 skupina odborníků navrhla protokol standardizovaného tukového tolerančního testu, který by mohl být použit za tímto účelem. Test je prováděn po minimálně 8 hodinách lačnění. Vyšetřovaná osoba obdrží tekuté jídlo obsahující 75 g tuku, 25 g sacharidů a 10 g proteinu a triglyceridémie je stanovena před a 4 hodiny po podání jídla (Kolovou *et al.*, 2011).

Prvním cílem mé práce bylo určit, jak sekrece inzulínu vyvolaná podáním sacharidů ovlivňuje průběh postprandiální lipémie po podání tukové zátěže. Studie byla provedena u 30 zdravých dobrovolníků. Dobrovolníci konzumovali experimentální jídlo obsahující buď 75 g tuku + 25 g glukózy, nebo pouze 75 g tuku v kontrolním experimentu. Krev byla odebrána před jídlem a ve vybraných časových bodech po jídle během následujících 8 hodin. Přidání glukózy neovlivnilo postprandiální triglyceridémii nebo koncentrace cholesterolu a TG v lipoproteinech bohatých na TG (TRL-C a TRL-TG) hodnocené jako plocha pod křivkou těchto parametrů. Přidání glukózy ale stimulovalo rychlejší odpověď chylomikronů na testované jídlo, což bylo hodnoceno na základě změn v koncentraci apolipoproteinu B-48. Glukóza přidaná k tukové zátěži indukovala nárůst glykémie a inzulinémie. Přidání glukózy k tukové zátěži bylo překvapivě spojeno s nižší odpovědí celkového a aktivního glukagonu podobného peptidu 1 (GLP-1) než po podání čistě tukové zátěže.

Druhým cílem mé práce bylo u stejné skupiny dobrovolníků zjistit, zda polymorfismy -1131T>C (rs662799) a 56C>G (rs3135506) genu *APOA5* mají vliv na průběh postprandiální lipémie, která byla indukována podáním buď samotného tuku, nebo tuku s glukózou. Apolipoprotein A-V významně ovlivňuje koncentraci plazmatických TG. Ve skupině 30 dobrovolníků bylo sedm dobrovolníků heterozygotní pro variantu -1131C a tři dobrovolníci byli heterozygotní pro variantu 56G (HT), 20 dobrovolníků bylo „wild-type“ (WT). HT měli o 42 % vyšší postprandiální odpověď postprandiální triglyceridémie po podání samotné tukové zátěže než WT. Přidání glukózy k tukové zátěži tento rozdíl potlačilo. Tento náález naznačuje, že složení jídla moduluje vliv těchto polymorfismů na rozsah postprandiální lipémie.

Třetím cílem mé práce bylo určit, zda stanovení rozsahu postprandiální lipémie hodnoceného pomocí tukového tolerančního testu může zlepšit predikci aterosklerotického poškození, které bylo hodnoceno pomocí 4 neinvazivních klinických vyšetření (ultrazvukové vyšetření tloušťky intimy-medie, arteriální tuhosti, endoteliální dysfunkce a stanovení kalciového skóre pomocí CT). Studie byla provedena u 73 postmenopauzálních žen pomocí standardizovaného tukového tolerančního testu (Kolovou *et al.*, 2011). Nebyla nalezena žádná asociace mezi postprandiální triglyceridemií a aterosklerotickým poškozením hodnoceným těmito metodami. Ženy se zvýšenou koncentrací TG a obvodem pasu (hypertriglyceridemický pas, EWET) měly zvýšenou tloušťku intimy-medie a Belcaro skóre. Naše data nepodporují myšlenku, že použití tukového tolerančního testu může významně přispět k predikci aterosklerotického poškození v klinické praxi.

## Abstract

Increased triglyceride (TG) concentration has been generally accepted as a risk factor for ischemic heart disease and, therefore, lowering TG is therapeutic target that should reduce cardiovascular disease risk. Traditionally, concentration of TG is measured in the fasting state (8–12 hours after an overnight fasting) mainly because the rise in TG levels after meal leads to the high variation in TG values. However, human beings spend larger portion of the day in a postprandial state and postprandial hypertriglyceridemia may then play a substantial role in determination of cardiovascular disease risk. The increased and prolonged postprandial lipemia has been found in patients with coronary heart disease. Moreover, recent data from Copenhagen Heart Study point out that the non-fasting TG concentration is associated with cardiovascular disease risk more tightly than the fasting TG concentration. Importantly, concentration of non-fasting TG is substantially affected by individual behavioural habits such as diet composition and physical activity. It remains to be determined whether it would be appropriate to identify individuals at higher risk of cardiovascular disease due to increased postprandial TG using tolerance test analogous to glucose tolerance test. The protocol of standardized fat tolerance test (FTT) that can be used for such a purpose was proposed by an Expert Panel group in 2010. The test is carried out after min. 8 hour fast, subjects receive the liquid meal that consists of 75 g of fat, 25 g of carbohydrates and 10 g of protein, and triglyceridemia is determined before and 4 hours after meal (Kolovou *et al.*, 2011).

First aim of my thesis was to determine how insulin secretion induced by administration of carbohydrate affects the course of postprandial lipemia after fat load administration. The study was carried out in 30 healthy male volunteers. Men consumed an experimental meal containing either 75 g of fat + 25 g of glucose or 75 g of fat in a control experiment. Blood was taken before the meal and at selected time points within the following 8 hours. The addition of glucose did not affect the magnitude of postprandial triglyceridemia and triglyceride-rich lipoprotein-cholesterol and triglyceride (TRL-C and TRL-TG, respectively) concentrations (evaluated as areas under curves) but stimulated a faster response of chylomicrons to the test meal, evaluated as changes in apolipoprotein B-48 concentrations. Glucose added to a fat load induced an increase of glycemia and insulinemia and, surprisingly, a 20% lower response of both total and active glucagon-like peptide-1 (GLP-1) concentrations compared to the test in which only fat was given to subjects.

Second aim of my thesis was to determine in the same group of volunteers whether polymorphisms -1131T>C (rs662799) and 56C>G (rs3135506) of the *APOA5* gene have an impact on the course of postprandial lipemia induced by a fat load and a fat load with added glucose. Apolipoprotein A-V plays an important role in the determination of plasma triglyceride (TG) concentration. In the group of 30 volunteers seven subjects were heterozygous for the -1131C variant and three for the 56G variant (HT carriers), twenty were wild-type carriers (WT carriers). HT carriers had a 42 % higher postprandial response after fat load than WT carriers. Glucose added to the test meal suppressed such a difference. These findings suggest that the meal composition modulates the effect of these polymorphisms on the magnitude of postprandial lipemia.

Third aim of my thesis was to determine whether magnitude of postprandial lipemia evaluated by FTT can improve prediction of atherosclerotic injury that was assessed by four non-invasive clinical methods (ultrasound examination of intima-media thickness, arterial stiffness and endothelial dysfunction and CT calcium scan). The study was carried out in 73 postmenopausal women using standard FTT as recommended by Kolovou *et al.*, 2011. There were no associations between postprandial triglyceridemia and atherosclerotic injury as evaluated using these methods. Interestingly, women with increased triglyceridemia and waist (hypertriglyceridemic waist, EWET) had increased intima-media thickness and Belcaro score. Our data do not support the idea that the use of FTT can significantly improve the prediction of atherosclerotic injury in clinical practice.



## Obsah

<b>1.</b>	<b>Literární přehled.....</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Úloha triacylglycerolů v metabolismu.....</i>	<i>1</i>
1.1.1	Exogenní dráha transportu triacylglycerolů .....	2
1.1.1.1	Chylomikrony .....	2
1.1.2	Endogenní transport triacylglycerolů.....	3
1.1.2.1	Lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL).....	3
1.1.3	Apolipoprotein B .....	5
1.1.4	Lipoproteinová lipáza .....	5
1.1.5	Regulace metabolismu tuků .....	6
1.1.5.1	Lačnění .....	6
1.1.5.2	Postprandiální stav .....	7
1.2	<i>Cholesterol .....</i>	<i>9</i>
1.3	<i>Postprandiální lipémie.....</i>	<i>10</i>
1.4	<i>Faktory ovlivňující postprandiální lipémii .....</i>	<i>12</i>
1.4.1	Pohlaví .....	12
1.4.2	Věk.....	12
1.4.3	Fyzická aktivita.....	12
1.4.4	Složení jednorázového pokusného jídla.....	13
1.4.5	Dlouhodobá dieta.....	13
1.4.6	Alkohol.....	13
1.4.7	Genetické faktory.....	15
1.4.7.1	Apolipoprotein E.....	15
1.4.7.2	Lipoproteinová lipáza.....	15
1.4.7.3	Apolipoprotein A-V .....	16
1.4.8	Terapie .....	17
1.5	<i>Metody testování postprandiální lipémie.....</i>	<i>18</i>
1.5.1	Stanovení lipidů .....	19
1.5.2	Stanovení lipoproteinů .....	19
1.5.2.1	Separace lipoproteinů .....	19
1.5.2.2	Rozlišení původu lipoproteinů pomocí specifických markerů .....	20
1.5.3	Stanovení retinylpalmitátu .....	21
1.6	<i>Postprandiální lipémie a ateroskleróza .....</i>	<i>21</i>
1.7	<i>Testování postprandiální lipémie v klinické praxi.....</i>	<i>24</i>
<b>2.</b>	<b>Cíle práce.....</b>	<b>25</b>

<b>3.</b>	<b>Vliv glukózy na průběh postprandiální lipémie .....</b>	<b>26</b>
3.1	Úvod.....	26
3.2	Materiál a metody.....	28
3.2.1	Uspořádání experimentu u zdravých dobrovolníků.....	28
3.2.2	Stanovení lipidů, glukózy a NEMK.....	29
3.2.3	Ultracentrifugace .....	29
3.2.4	Stanovení inzulínu .....	30
3.2.5	Stanovení koncentrace LPL a apolipoproteinů.....	30
3.2.6	Stanovení koncentrace GLP-1 .....	30
3.2.7	Statistické zpracování výsledků.....	31
3.3	Výsledky .....	32
3.3.1	Vliv podání tuku a glukózy na sekreci GLP-1 .....	33
3.3.2	Vliv podání tuku a glukózy na transport TG.....	36
3.4	Diskuze.....	43
3.4.1	Vliv podání tuku a glukózy na sekreci GLP-1 .....	43
3.4.2	Vliv podání tuku a glukózy na TG .....	45
<b>4.</b>	<b>Vliv genotypu APOA5 na průběh postprandiální lipémie.....</b>	<b>49</b>
4.1	Úvod.....	49
4.2	Materiál a metody.....	50
4.2.1	Stanovení polymorfismu APOA5 .....	50
4.2.1.1	Izolace DNA .....	50
4.2.1.2	Genotypizace APOA5.....	50
4.2.2	Statistické zpracování výsledků.....	52
4.3	Výsledky .....	53
4.4	Diskuze.....	60
<b>5.</b>	<b>Postprandiální lipémie a ateroskleróza hodnocená neinvazivními klinickými metodami .....</b>	<b>65</b>
5.1	Úvod.....	65
5.2	Materiál a metody.....	67
5.2.1	Uspořádání experimentu u pacientů .....	67
5.2.2	Klinická neinvazivní vyšetření .....	67
5.2.2.1	Vyšetření endoteliální dysfunkce.....	67
5.2.2.2	Vyšetření arteriální tuhosti .....	68
5.2.2.3	Vyšetření tloušťky intimy-medie.....	68
5.2.2.4	Stanovení kalciového skóre .....	69

5.2.3	Statistické zpracování výsledků.....	70
5.3	<i>Výsledky</i> .....	70
5.3.1	Hodnocení endoteliální dysfunkce .....	72
5.3.2	Hodnocení arteriální tuhosti .....	72
5.3.3	Hodnocení tloušťky intimy-medie.....	73
5.3.4	Hodnocení kalciového skóre .....	74
5.4	<i>Diskuze</i> .....	82
<b>6.</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>84</b>
<b>7.</b>	<b>Seznam obrázků .....</b>	<b>85</b>
<b>8.</b>	<b>Seznam tabulek .....</b>	<b>86</b>
<b>9.</b>	<b>Seznam literatury .....</b>	<b>87</b>
<b>10.</b>	<b>Seznam publikací a prezentací.....</b>	<b>102</b>
10.1	<i>Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace</i> .....	102
10.2	<i>Publikace in extenso bez vztahu k tématu disertace</i> .....	102
10.3	<i>Prezentace na konferencích</i> .....	103
<b>11.</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>106</b>
11.1	<i>Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace</i> .....	106
11.1.1	K. Zemánková <i>et al.</i> , <i>Physiol Res.</i> (2015).....	106
11.1.2	K. Zemánková <i>et al.</i> , <i>Physiol Res.</i> (2015).....	114
11.1.3	J. Kovář <i>et al.</i> , <i>Physiol Res.</i> (2015) .....	133
11.1.4	K. Zemánková <i>et al.</i> , <i>Metabolism</i> (2015) .....	139
11.2	<i>Publikace in extenso bez vztahu k tématu disertace</i> .....	146
11.2.1	T. Blahová <i>et al.</i> , <i>Physiol Res</i> (2016) .....	146

## Seznam zkratek

Acetyl-CoA	Acetylkoenzym A	Acetyl coenzyme A
AK	Aminokyselina	Amino acid
ANOVA	Analýza rozptylu	Analysis of variance
Apo	Apolipoprotein	Apolipoprotein
ATGL	Triglyceridová lipáza tukové tkáně	Adipose triglyceride lipase
AUC	Plocha pod křivkou	Area under curve
AUIC	Plocha pod přírůstkovou křivkou	Area under incremental curve
BMI	Index tělesné hmotnosti	Body mass index
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát	Cyclic adenosine monophosphate
CM	Chylomikron	Chylomicron
CT	Počítačová tomografie	Computer tomography
DBP	Diastolický krevní tlak	Diastolic blood pressure
DG	Diacylglycerol	Diglyceride
DPP-4	Dipeptidylpeptidáza-4	Dipeptidyl peptidase-4
EAS	Evropská společnost pro aterosklerózu	European Atherosclerosis Society
ER	Endoplazmatické retikulum	Endoplasmic reticulum
ESC	Evropská kardiologická společnost	European Society of Cardiology
EWET	Hypertriglyceridemický pas	Enlarged waist elevated triglycerides
GIP	Glukózo-dependentní inzulinotropní peptid	Glucose-dependent insulinotropic polypeptide
GLP-1	Glukagonu podobný peptid	Glucagon-like peptide-1
GPIHBP1	Protein vázající HDL ukotvený na GPI	GPI anchored HDL binding protein
HDL	Lipoprotein o vysoké hustotě	High density lipoprotein
HDL-C	HDL cholesterol	HDL-Cholesterol
HOMA-IR	Homeostatický index inzulínové rezistence	Homeostatic model assessment of insulin resistance
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	High-performace liquid chromatography
HSL	Hormon senzitivní lipáza	Hormone sensitive lipase

HSPG	Heparansulfátproteoglykan	Heparan sulfate proteoglycan
HT	Heterozygot	Heterozygous
HTGL	Jaterní lipáza	Hepatic triglyceride lipase
IDL	Lipoprotein o střední hustotě	Intermediate density lipoprotein
ICHS	Ischemická choroba srdeční	Ischemic heart disease
IKEM	Institut klinické a experimentální medicíny	Institute for Clinical and Experimental Medicine
IMT	Tloušťka intimy-medie	Intima-media thickness
IP <sub>3</sub>	Fosfatidylinositol-1,4,5-trifosfát	Inositol 1,4,5-trisphosphate
<i>i.v.</i>	Intravenózní	Intravenous
KVO	Kardiovaskulární onemocnění	Cardiovascular disease
LDL	Lipoprotein o nízké hustotě	Low density lipoprotein
LDL-C	Cholesterol v LDL	LDL-Cholesterol
LPL	Lipoproteinová lipáza	Lipoprotein lipase
MG	Monoacylglycerol	Monoacylglycerol
MGL	Monoacylglycerol lipáza	Monoacylglycerol lipase
MK	Mastná kyselina	Fatty acid
MTP	Mikrosomální protein přenášející TG	Microsomal TG transfer protein
NEMK	Neesterifikované mastná kyselina	Nonesterified fatty acid
OGTT	Orální glukózový toleranční test	Oral glucose tolerance test
PAT	Periferní arteriální tonus	Peripheral arterial tone
PCR	Polymerázová řetězová reakce	Polymerase chain reaction
PKA	Proteinkináza A	Proteinkinase A
PPAR	Receptor aktivovaný peroxizómovými proliferátory	Peroxisome proliferator-activated receptor
PWV	Rychlost pulzní vlny	Pulse wave velocity
RChol	Remnantní cholesterol	Remnant cholesterol
RHI	Reaktivní hyperemický index	Reactive hyperemic index
SBP	Systolický krevní tlak	Systolic blood pressure
SD	Směrodatná odchylka	Standard deviation
SE	Standardní chyba	Standard error
SNP	Jednonukleotidový polymorfismus	Single nucleotide polymorphism
SREBP2	Vazebný protein sterolového	Sterol regulator element

	regulačního elementu 2	binding protein 2
SGLT-1		Sodium-glucose linked transporter
TG	Triacylglycerol	Triglyceride
TGc	Kapilární triglyceridémie	Capillary triglycerides
TRL	Lipoprotein bohatý na TG	TG rich lipoprotein
TRL-C	Cholesterol v TRL	TRL-Cholesterol
TRL-TG	Triacylglyceroly v TRL	TRL-Triglycerides
T snídaně	Snídaně obsahující 75 g tuku	Breakfast containing 75 g of fat
T+G snídaně	Snídaně obsahující 75 g tuku + 25 g glukózy	Breakfast containing 75 g of fat + 25 g of glucose
USF	Upstream stimulační faktor	Upstream stimulatory factor
VLDL	Lipoprotein o velmi nízké hustotě	Very low density lipoprotein
VLDL-C	Cholesterol ve VLDL	VLDL-Cholesterol
VLDL-TG	Triacylglyceroly ve VLDL	VLDL-Triglycerides
WHR	Poměr pasu k bokům	Waist to hip ratio
WT	Wild type	Wild type

## 1. Literární přehled

### 1.1 Úloha triacylglycerolů v metabolismu

Mezi dvě hlavní lipidové komponenty v plazmě patří triacylglyceroly a cholesterol. Triacylglyceroly (TG) jsou estery trojsytného alkoholu glycerolu a mastných kyselin (MK) a jsou zdrojem energie pro většinu buněk. Ve svalové tkáni jsou mastné kyseliny uvolněné z TG v procesu  $\beta$ -oxidace postupně oxidovány až na acetylkoenzym A (acetyl-CoA), který následně vstupuje do Krebsova cyklu. V tukové tkáni jsou MK TG uskladněny a slouží zde jako energetická zásobárna, tepelná izolace a mechanická ochrana. Pro tělo je velmi výhodné uskládat energii v TG. Množství energie uvolněné z 1 gramu tuku je více než 2x větší než energie uvolněná ze stejného množství cukru či bílkovin. Cholesterol je součástí všech živočišných buněčných membrán, kde spoluvytváří jejich strukturální fluiditu, zároveň slouží jako prekurzor žlučových kyselin a steroidních hormonů.

TG a estery cholesterolu jsou nepolární látky, které díky své hydrofobicitě nemohou být transportovány v krevní plazmě (polární/vodní fáze), a proto k transportu lipidů v plazmě slouží lipoproteiny. Denně musí být plazmou přepraveno cca 100–200 g TG, z toho je polovina dietního a polovina endogenního původu (Frayn, 2002; Sorensen *et al.*, 2011).

Lipoproteiny jsou kulovité částice, které se skládají z nepolárního hydrofobního jádra (TG a estery cholesterolu) a z amfifilního obalu (proteiny, fosfolipidy a cholesterol). Podle velikosti a hustoty můžeme lipoproteiny rozdělit do 5 tříd (Tab. 1).

**Tab. 1: Přehled hlavních tříd lipoproteinů.**

Převzato z (Gotto & Pownall, 2003).

	<b>Lipoprotein</b>	<b>Velikost [nm]</b>	<b>Relativní hustota</b>
1.	Chylomikrony	75–1000	< 0,95
2.	Lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL)	30–80	< 1,006
3.	Lipoproteiny o střední hustotě (IDL)	25–40	1,006–1,019
4.	Lipoproteiny o nízké hustotě (LDL)	20–25	1,019–1,063
5.	Lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL)	7,5–10	1,063–1,210

Hlavní proteinové složky lipoproteinů se nazývají apolipoproteiny (apo). Tyto proteinové komponenty mají funkci strukturní a metabolickou. Apolipoproteiny mohou fungovat jako ligandy pro buněčné receptory nebo jako kofaktory pro enzymy podílející se na metabolismu lipoproteinů. Jsou tedy určující pro to, jak budou jednotlivé lipoproteiny metabolizovány.

### **1.1.1 Exogenní dráha transportu triacylglycerolů**

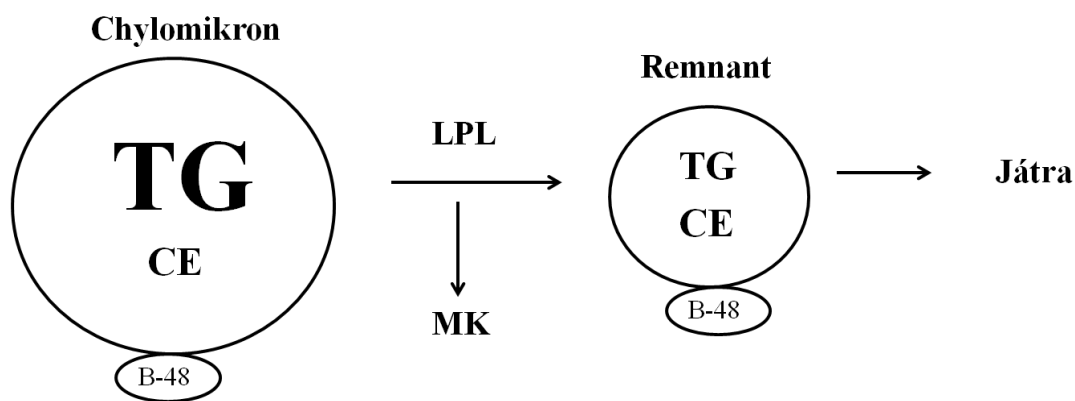
#### **1.1.1.1 Chylomikrony**

Tuky přijaté v potravě jsou v tenkém střevě pomocí žlučových kyselin emulgovány. Pankreatická lipáza rozštěpí potravou přijaté TG na volné mastné kyseliny a 2-monoacylglycerol (MG), které jsou absorbovány buňkami střevního epitelu. V hladkém endoplazmatickém retikulu (ER) buněk střevního epitelu dochází pomocí enzymatických reakcí ke kondenzaci mastných kyselin a 2-monoacylglycerolu, a tím vznikají TG. Hlavní apolipoprotein chylomikronů je apolipoprotein B-48 (apoB-48). ApoB-48 je syntetizován na ribosomech hrubého endoplazmatického retikula. Za pomoci mikrosomálního proteinu přenášejícího TG (MTP) dochází k transportu TG, esterů cholesterolu a fosfolipidů k apoB-48, a tím ke vzniku chylomikronů. Geneticky podmíněný deficit MTP vede k neschopnosti produkovat chylomikrony i lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL). Následkem je extrémní hypolipoproteinémie označovaná jako abetalipoproteinémie.

Nově vznikající chylomikrony jsou pomocí exocytózy secernovány buňkami střevního epitelu do lymfatického systému a přes *ductus thoracicus* vstupují do krevního řečiště. Nascentní chylomikrony se objeví v krevním řečišti 1 až 2 hodiny po podání jídla.

TG obsažené v chylomikronech jsou hydrolyzovány pomocí lipoproteinové lipázy (LPL), která se nachází na bazální membráně endoteliálních buněk kapilární stěny. Intravaskulární lipolýza odstraní 70–90 % TG z částic chylomikronů. Postupnou hydrolýzou TG vznikají remnanty chylomikronů (Bergman *et al.*, 1971; Cohen *et al.*, 2011; Frayn *et al.*, 2006). Nadbytečné povrchové složky chylomikronů – fosfolipidy, neesterifikovaný cholesterol a apolipoproteiny – jsou přeneseny na HDL částice. Vznikající remnanty už mají relativně nízký obsah TG a jsou vyloučeny v játrech (Obr. 1).





**Obr. 1: Metabolismus lipoproteinů exogenního původu.**

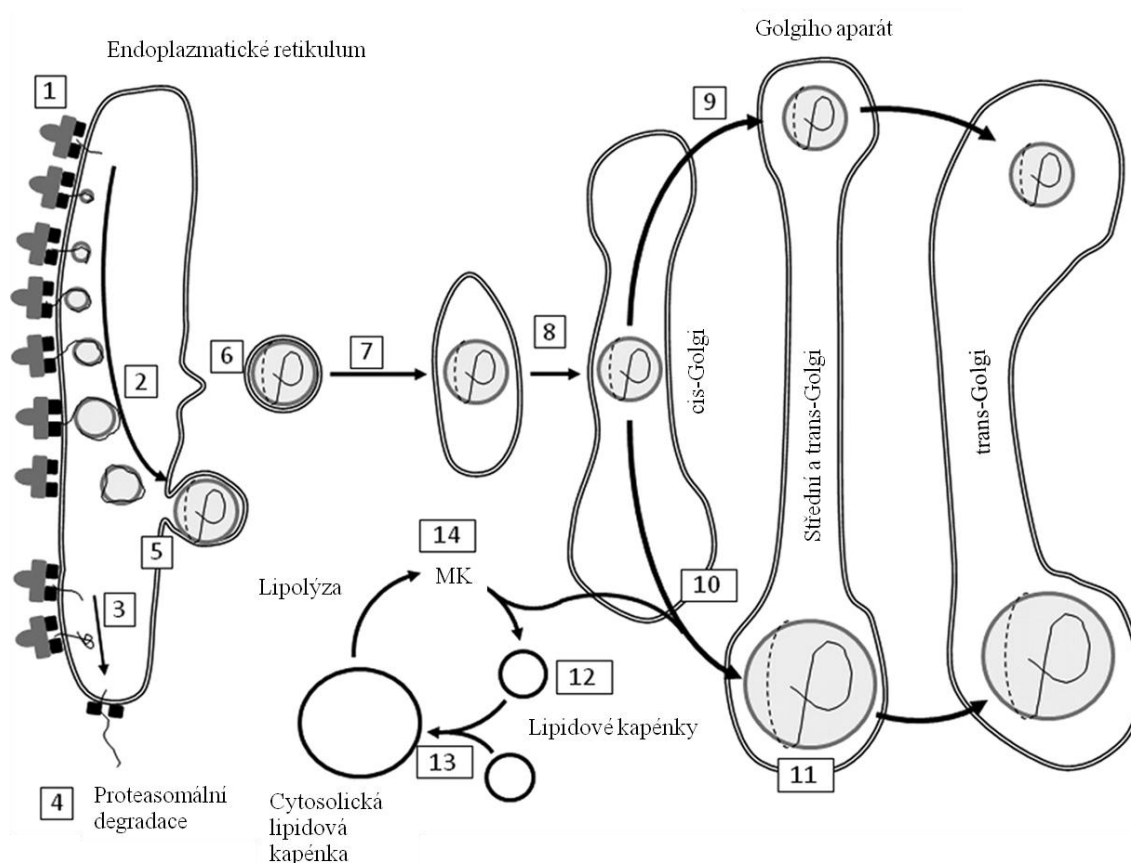
Částice chylomikronů jsou v cirkulaci hydrolyzovány pomocí lipoproteinové lipázy (LPL). Postupnou hydrolýzou triacylglycerolů (TG) v chylomikronech vznikají remnanty chylomikronů, které jsou vychytávány v játrech. Hlavním apolipoproteinem lipoproteinů exogenního původu je apolipoprotein B-48 (apoB-48).

## 1.1.2 Endogenní transport triacylglycerolů

### 1.1.2.1 Lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL)

Lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL) jsou produkovány v játrech. TG částic VLDL vznikají buď ze sacharidů, které jsou v procesu lipogeneze konvertovány na mastné kyseliny (MK) nebo z MK, které jsou uvolněny při lipolýze z tukové tkáně a vychytány játry. Tyto MK jsou následně esterifikovány s glycerolem a vznikají TG (Lewis, 1997).

Syntéza VLDL začíná na membráně endoplazmatického retikula (ER), kde je syntetizován apolipoprotein B-100 (apoB-100). Následně je apoB-100 lipidováno pomocí MTP, které ještě před dokončením translace začíná přenášet lipidy na molekulu apoB-100, a dochází ke vzniku částice označované jako pre-VLDL. Částice pre-VLDL jsou následně lipidovány za vzniku „maturovaných“ VLDL, které jsou poté secernovány do cirkulace (Obr. 2) (Olofsson & Boren, 2005).

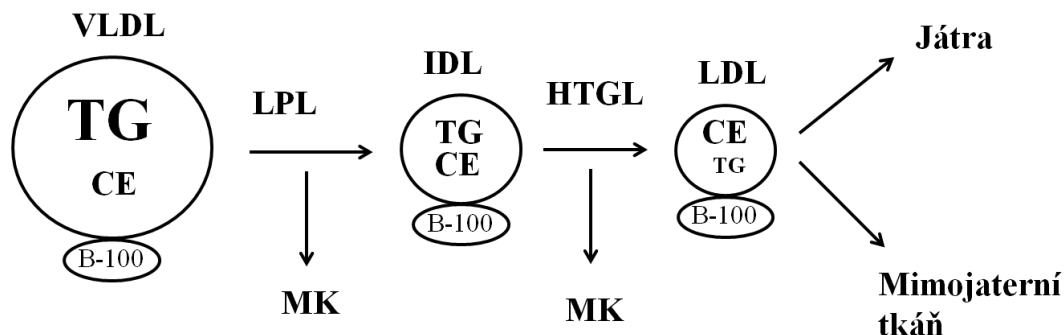


**Obr. 2: Syntéza a sekrece lipoproteinů obsahující apoB-100.**

Apolipoprotein B (apoB) je syntetizován a translokován do lumen endoplazmatického retikula (ER) (1). Rostoucí molekula apoB je kotranslačně lipidována pomocí mikrosomálního proteinu přenášející triacylglyceroly (MTP) a dochází ke vzniku pre-VLDL částice (2). Pokud apoB není lipidováno (3), je degradováno v proteasomech (4). Částice pre-VLDL opouští ER pomocí váčků (6), následně váček fúzuje s *cis* Golgiho aparátem (8). Takto vzniklé VLDL jsou transportovány sekreční dráhou a následně secernovány (9).

Převzato z (Adiels *et al.*, 2008).

V krevním řečišti jsou VLDL rovněž hydrolyzovány pomocí LPL. Postupnou hydrolýzou TG a tím i ubývajícím počtem TG vznikají lipoproteiny o střední hustotě (IDL), další postupnou hydrolýzou vznikají lipoproteiny o nízké hustotě (LDL). Část LDL částic je katabolizována mimojaterními buňkami a část LDL částic se vrací zpět do jater, kde jsou pomocí LDL-receptoru endocytovány a rozloženy pomocí lyzosomálních enzymů (Obr. 3).



**Obr. 3: Metabolismus lipoproteinů endogenního původu.**

Lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL) jsou v cirkulaci hydrolyzovány pomocí lipoproteinové lipázy (LPL). Postupnou hydrolýzou triacylglycerolů (TG) ve VLDL vznikají lipoproteiny o střední hustotě (IDL). Částice IDL jsou v cirkulaci hydrolyzovány pomocí jaterní lipázy (HTGL) a postupnou hydrolýzou jejich TG vznikají lipoproteiny o nízké hustotě (LDL). Částice LDL jsou vychytávány v játrech. Hlavním apolipoproteinem lipoproteinů endogenního původu je apolipoprotein B-100 (apoB-100).

### 1.1.3 Apolipoprotein B

Apolipoprotein B je velký amfipatický glykoprotein, který existuje ve dvou formách - apoB-100 a apoB-48. Dvě formy apoB - apoB-100 a apoB-48 - jsou dle genetických a biochemických důkazů produkty stejného genu (Cladaras *et al.*, 1986). V játrech i střevě je tedy přítomna stejná mRNA pro apoB (Glickman *et al.*, 1986). U člověka je mRNA v enterocytech editována komplexem označovaným jako APOBEC (Blanc & Davidson, 2010). Při editaci dochází k záměně cytosinu v pozici 6666 za uracil za vzniku stop kodonu. V lidských játrech k editaci nedochází. Velikost apoB-48 odpovídá 48 % velikosti apoB-100, proteiny mají shodný N-konec.

ApoB-100 je exprimován v játrech a nachází se na VLDL, IDL a LDL částicích. ApoB-48 je exprimován ve střevě a nachází se na chylomikronech a jejich remnantech (Olofsson *et al.*, 2005).

### 1.1.4 Lipoproteinová lipáza

Lipoproteinová lipáza (LPL) je produkována buňkami mimojaterních tkání, především tkáně tukové a svalové. LPL hydrolyzuje TG v lipoproteinech bohatých na triacylglyceroly (TRL), tedy TG v chylomikronech a ve VLDL. Hydrolýzou TG vznikají mastné kyseliny, které jsou vychytávány mimojaterními tkáněmi (především svalovou a tukovou tkání) (Olivecrona & Olivecrona, 1995). Nalačno nebo při svalové práci je aktivita LPL zvýšená ve svalové tkáni a MK jsou oxidovány za vzniku energie, CO<sub>2</sub> a vody (β-oxidace). Po jídle je aktivita LPL zvýšená v tukové tkáni a uvolněné MK jsou tedy přednostně vychytány adipocyty a uskladněny v podobě TG jako zásobárna

energie. Aktivita LPL v různých tkáních je regulována tkáňově diferenciovaně - katecholaminy aktivují LPL ve svalu zatímco inzulín zvyšuje aktivitu LPL v tukové tkáni. Vlastními efekty účinku hormonů na aktivitu LPL jsou proteiny podobné angiopoetinu 3 a 4 (Angptl3 a Angptl4), které jsou inhibitory LPL. Angptl3 se tvoří hlavně v játrech a reverzibilně inhibuje aktivitu LPL tím, že blokuje katalytickou i nekatalytickou funkci LPL (Liu *et al.*, 2010). Angptl4 inhibuje LPL a zpomaluje katabolismus lipoproteinů tak, že ireverzibilně přeměňuje katalyticky aktivní dimery LPL na inaktivní monomery (Mattijssen & Kersten, 2012; Sukonina *et al.*, 2006). Exprese těchto proteinů je v jednotlivých tkáních hormonálně regulována tak, aby zajistila směřování toku MK do tkání dle energetických potřeb organismu. Malá část MK uvolněných působením LPL není vychytána tkáněmi, uniká do cirkulace a následně je vychytána a metabolizována v játrech („*spillover fatty acids*“).

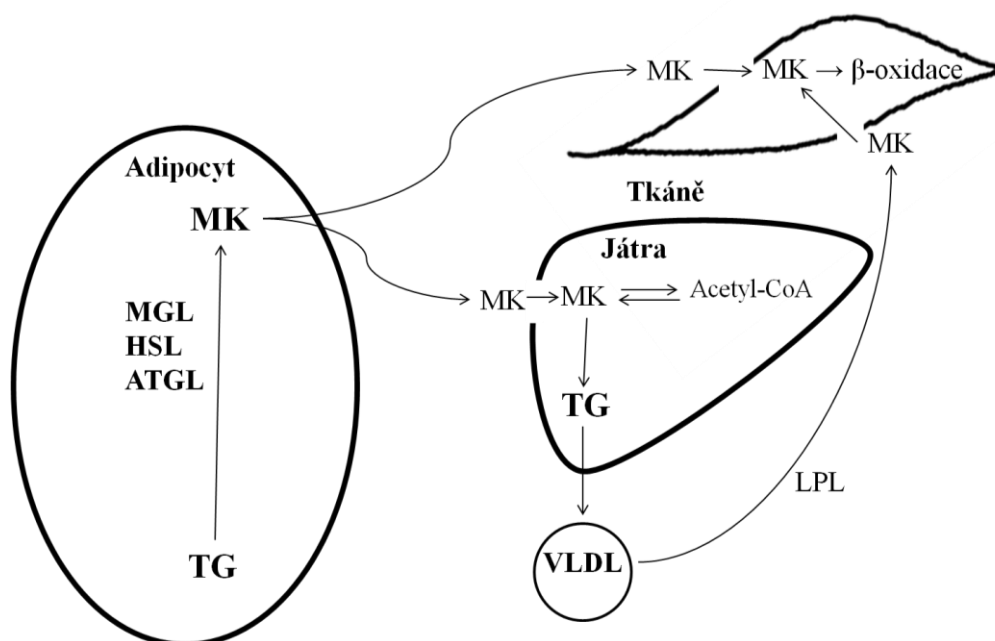
LPL je glykoprotein, který je syntetizován parenchymálními buňkami příslušné tkáně (např. myocyty a adipocyty). Enzym je z parenchymálních buněk translokován do subendoteliálního prostoru a přenesen prostřednictvím GPIHBP1 (glycosylphosphatidylinositol-anchored HDL-binding protein 1) na lumenální stranu kapilárního endotelu. Zde může být navázán na heparansulfátproteoglykan (HSPG), případně zůstane ukotven pomocí GPIHBP1 (Braun & Severson, 1992; Davies *et al.*, 2012). Důležitým kofaktorem LPL je apolipoprotein C-II (apo C-II). Apo C-II je exprimován v játrech a ve střevě a je přítomný na povrchu chylomikronů, VLDL a HDL (Kei *et al.*, 2012; Mead *et al.*, 2002). Deficit LPL, apo C-II a GPIHBP1 vede k rozvoji masivní hypertriglyceridémie (Dallinga-Thie *et al.*, 2010).

### 1.1.5 Regulace metabolismu tuků

#### 1.1.5.1 Lačnění

Při lačnění, kdy je v cirkulaci nedostatek glukózy z potravy, jsou hlavním zdrojem energie pro svalové buňky mastné kyseliny, které jsou uloženy v tukové tkáni vázané v molekulách TG. Tyto mastné kyseliny jsou uvolněny při lipolýze, která je stimulována hormonálně pomocí  $\beta$ -adrenergních agonistů. Hormon (např. adrenalin) se naváže na  $\beta$ -adrenergní receptor spářený s  $G_s$  proteinem, a tím dochází k aktivaci adenylátcyklázy. Zvýšená hladina cAMP (cyklický adenosimonofosfát) aktivuje proteinkinázu A (PKA), která fosforyluje perilipin-1 a hormon senzitivní lipázu (HSL), čímž dochází k její aktivaci. Fosforylace perilipinu-1 aktivuje triglyceridovou lipázu tukové tkáně (ATGL).

Počáteční krok hydrolyzy TG je katalyzován triglyceridovou lipázou tukové tkáně. ATGL štěpí s vysokou účinností a specificitou TG a vykazuje pouze slabou lipázovou aktivitu k diacylglycerolům (DG) a fosfolipidům. ATGL preferenčně hydrolyzuje mastné kyseliny v pozici *sn-2*, a tím dochází k produkci *sn-1,3* DG. Vzniklé DG jsou hlavním substrátem pro HSL, která DG hydrolyzuje s 10x větší účinností než TG. HSL štěpí také MK v MG, estery cholesterolu a retinolu. HSL preferenčně štěpí esterové vazby v pozici *sn-3* a *sn-1*, a hydrolyzuje tedy DG vzniklé působením ATGL. Produkty ATGL a HSL jsou *sn-1* a *sn-2* monoacylglyceroly. Hlavním enzymem zodpovědným za katabolismus MG je monoacylglycerol lipáza (MGL) (Young & Zechner, 2013). ATGL, HSL a MGL jsou zodpovědné za více než 90 % celkové lipolytické aktivity v bílé tukové tkáni (Schweiger *et al.*, 2006). Část uvolněných mastných kyselin je z cirkulace vychytána extrahepatálními tkáněmi jako zdroj energie a další část MK je vychytána játry, které z nich resyntetizují TG a ty poté exportují v částicích VLDL do cirkulace (Obr. 4).



**Obr. 4: Metabolismus triacylglycerolů při lačnění.**

Při lačnění dochází v adipocytech k hydrolyze triacylglycerolů (TG) na volné mastné kyseliny (MK) pomocí triglyceridové lipázy tukové tkáně (ATGL), hormon senzitivní lipázy (HSL) a monoacylglycerol lipázy (MGL). Uvolněné MK jsou transportovány do tkání. V mimojaterních tkáních jsou MK oxidovány v procesu  $\beta$ -oxidace. Játra mohou MK využít jako zdroj energie nebo z nich resyntetizovat TG, které jsou poté transportovány do mimojaterních tkání v lipoproteinech o velmi nízké hustotě (VLDL).

### 1.1.5.2 Postprandiální stav

Ve střevě jsou TG přijaté v potravě hydrolyzovány na MG a MK, z těchto komponent jsou v enterocytech resyntetizovány TG. Vzniklé TG jsou inkorporovány

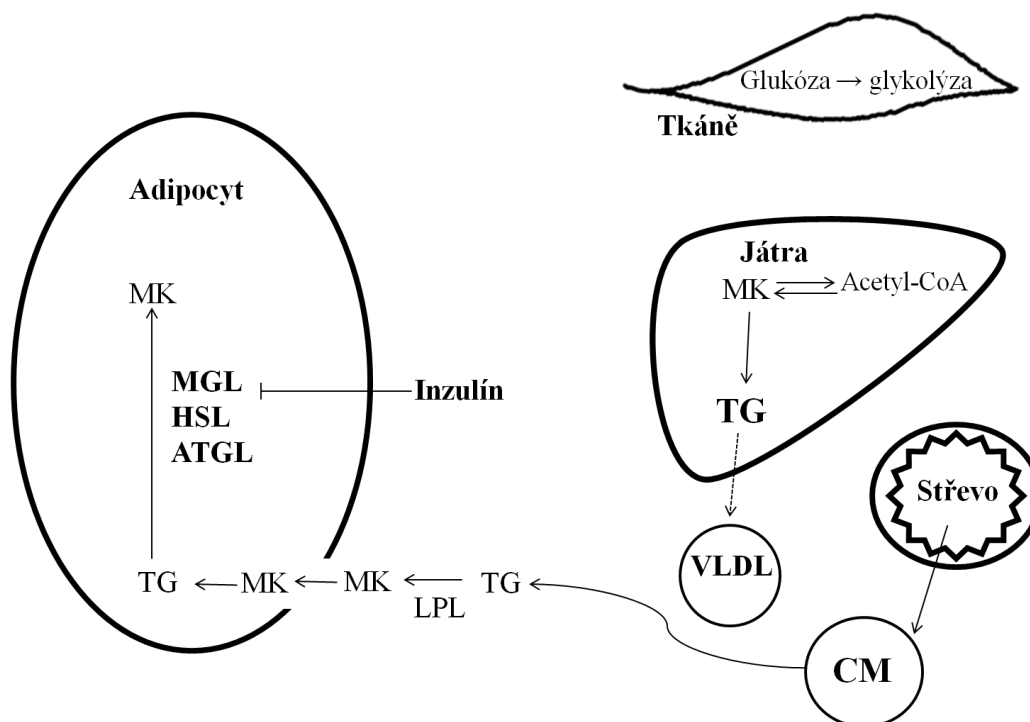
do chylomikronů, které na rozdíl od ostatních nutrientů nevstupují do portálního řečiště, ale jsou do systémové cirkulace transportovány přes *ductus thoracicus*. V cirkulaci je z HDL na chylomikrony přenesen apo C-II a jejich TG jsou rychle hydrolyzovány LPL. Poločas chylomikronů v cirkulaci se pohybuje v řádech minut.

Podání jídla, které je složeno ze všech základních živin, tedy z cukrů, tuků a bílkovin, vyvolá v organismu rozsáhlé metabolické změny. Vzestup koncentrace glukózy v cirkulaci indukuje sekreci inzulínu, který přestaví metabolismus na přednostní utilizaci sacharidů, MK dietního původu jsou v této fázi směřovány do tukové tkáně, kde jsou ukládány. Významnou úlohu v procesu hrají i nově objevené inkretiny - glukagonu podobný peptid 1 (GLP-1) a glukózo-dependentní inzulintropní polypeptid (GIP) (Drucker, 2006) - jejichž funkcí je zvýšit sekreci inzulínu.

Po uvolnění inzulínu do cirkulace dochází ve svalové tkáni ke zvýšenému vychytávání glukózy. Paralelně dochází ke snížení aktivity LPL v této tkáni (Farese *et al.*, 1991), což vede ke zvýšené utilizaci glukózy v glykolýze.

V tukové tkáni inzulín inhibuje aktivitu HSL (Frayn, 2002), čímž dochází k supresi uvolňování MK z TG. Současně dochází ke zvýšení aktivity LPL, a tím ke zvýšenému vychytávání MK adipocyty a jejich ukládání ve formě TG (Nilsson-Ehle *et al.*, 1975; Sadur & Eckel, 1982). Efekt inzulínu v postprandiální fázi zajistí retenci MK v tukové tkáni ve formě TG při nadbytku glukózy v cirkulaci (Obr. 5).

Inzulín inhibuje lipolýzu v tukové tkáni, a proto dochází k bezprostřednímu poklesu koncentrace MK v cirkulaci. To lze dobře dokumentovat po podání glukózy při orálním glukózovém tolerančním testu (OGTT). Po podání jídla obsahujícího kromě cukru i tuk je pokles MK pouze přechodný, neboť úbytek MK z tukové tkáně je kompenzován nárůstem koncentrace MK, které jsou uvolněny LPL a nejsou vychytány tkáněmi („*spillover of fatty acids*“) (Adiels *et al.*, 2015; Sorensen *et al.*, 2011).



**Obr. 5: Metabolismus triacylglycerolů po jídle.**

Tracylglyceroly (TG) dietního původu jsou prostřednictvím chylomikronů (CM) transportovány ze střeva do cirkulace. TG jsou hydrolyzovány pomocí lipoproteinové lipázy (LPL) a jsou uvolňovány volné mastné kyseliny (MK). Uvolněné MK jsou vychytávány adipocyty, kde jsou reesterifikovány a uloženy jako TG. Inzulín inhibuje triglyceridovou lipázu tukové tkáně (ATGL), monoacylglycerol lipázu (MGL) a hormon senzitivní lipázu (HSL) a tím inhibuje lipolýzu v tukové tkáni. Po vylití inzulínu dochází ve svalové tkáni ke zvýšenému vychytávání glukózy a paralelně dochází k poklesu aktivity LPL.

## 1.2 Cholesterol

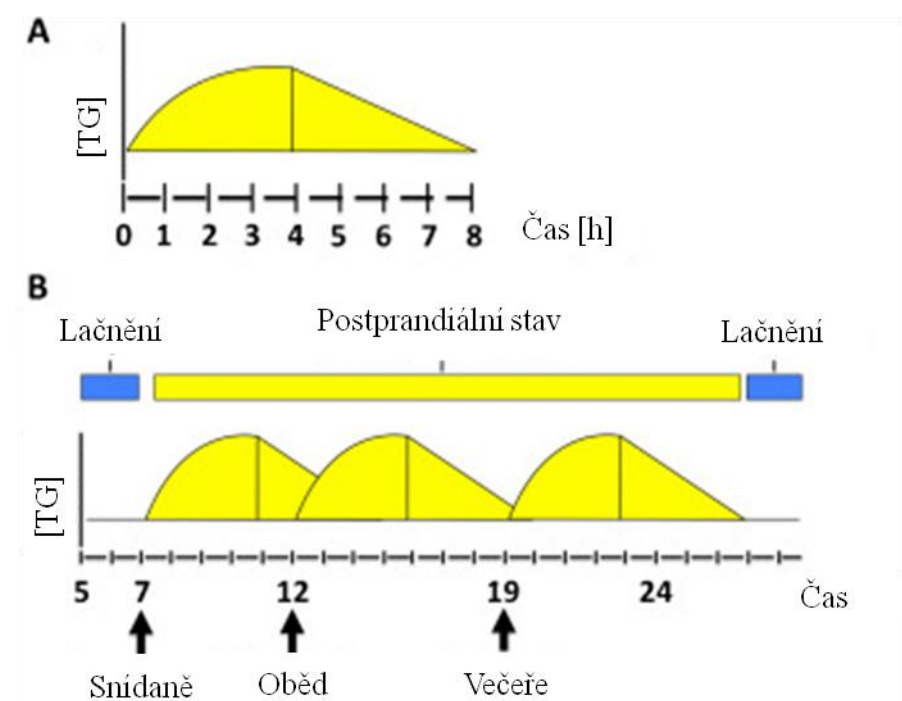
Cholesterol je součástí všech buněčných membrán, kde jeho obsah významně ovlivňuje jejich fyzikální vlastnosti, např. snížení jejich fluidity. Zároveň slouží jako prekurzor žlučových kyselin a steroidních hormonů. Cholesterol je v krvi transportován pomocí lipoproteinů. V povrchové vrstvě lipoproteinů je transportován amfipatický volný (neesterifikovaný) cholesterol, zatímco v hydrofóbním jádře lipoproteinů se nachází estery cholesterolu. Denní obrat cholesterolu v cirkulaci je více než řádově menší než denní obrat TG. Jeho koncentrace v plazmě se v průběhu dne významně nemění.

Cholesterol je buď přijímán v potravě nebo je živočišnými buňkami syntetizován. Prekurzorem pro syntézu cholesterolu je acetyl-CoA, který můžeme získat z glukózy, MK nebo aminokyselin (AK). Syntéza probíhá v hladkém ER a podílí se na ní více jak 20 enzymů. Syntéza cholesterolu je zpětnovazebně regulována pomocí SREBP-2 (vazebný protein sterolového regulačního elementu). Významným zdrojem cholesterolu pro buňky jsou LDL částice, které jsou buňkami vychytávány

prostřednictvím LDL-receptoru. Případný nadbytečný cholesterol může být ukládán jako cholesterylester. Kůra nadledvin a gonády syntetizují cholesterol ve větším množství a používají ho jako prekurzor pro syntézu steroidních hormonů (Boron & Boulpaep, 2012; Lieberman *et al.*, 2013).

### 1.3 Postprandiální lipémie

Jak je uvedeno výše, v postprandiální fázi (po jídle) se v cirkulaci objevují lipoproteiny transportující TG dietního původu, tedy chylomikrony a jejich remnanty. Koncentrace TG v plazmě dosáhne maxima 3–4 h po jídle a pomalu se vrací na původní koncentraci 6–8 h po jídle. Většina lidí během dne sní alespoň 3 jídla, a díky tomu tráví většinu dne v postprandiálním stavu (Obr. 6).



**Obr. 6: Změny v hladině triacylglycerolů po jídle.**

A - Koncentrace triacylglycerolů (TG) v plazmě dosáhne maxima 3–4 h po jídle a pomalu se vrací na původní koncentraci 6–8 h po jídle.

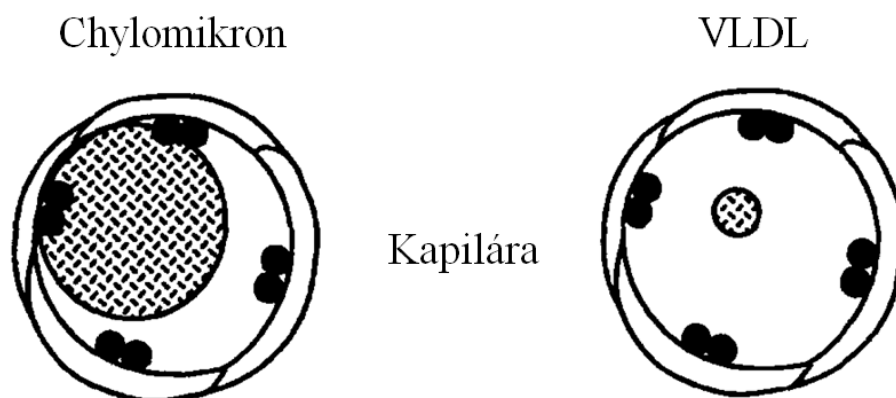
B - Lidé, kteří sní alespoň 3 jídla denně, stráví většinu dne v postprandiálním stavu.

Převzato z (Nakamura *et al.*, 2016).

V postprandiální fázi vzrůstá nejen koncentrace chylomikronů a jejich remnantů, ale i koncentrace VLDL-TG (Schneeman *et al.*, 1993). Vzestup VLDL-TG je vysvětlován tím, že v postprandiální fázi představují chylomikrony významně lepší substrát pro LPL, tudíž VLDL-TG jsou pomaleji metabolizovány. Částice chylomikronu o průměru až 1 mikrometr jsou řádově větší než částice VLDL (30–80 nm). Chylomikrony mají tedy větší pravděpodobnost, že budou interagovat s LPL (Obr. 7)



(Goldberg, 1996). Paradoxně proto v této fázi dochází k vzestupu koncentrace VLDL i přesto, že dochází ke snížení sekrece VLDL z jater, neboť inzulín tlumí sekreci VLDL a současně je snížen přísun MK uvolněných z tukové tkáně (Lewis *et al.*, 1993).



**Obr. 7: Interakce TRL a LPL v cirkulaci.**

Chylomikrony jsou větší částice než lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL) a mají tedy větší pravděpodobnost, že jejich triacylglyceroly (TG) budou hydrolyzovány lipoproteinovou lipázou (LPL). Převzato z (Goldberg, 1996).

Vzhledem k výše diskutované variabilitě triglyceridémie v průběhu dne byla koncentrace TG v plazmě/séru tradičně měřena ráno nalačno, většinou po 8–12 h nočním lačněním. Stanovení nalačno bylo prováděno i proto, že cholesterol v LDL (LDL-C) byl vypočítáván z Friedewaldovy rovnice (Friedewald *et al.*, 1972; Warnick *et al.*, 1990). V rovnici je prováděna adjustace na obsah cholesterolu ve VLDL (VLDL-C), která vychází z toho, že poměr VLDL-C/VLDL-TG je v lačnicích VLDL cca 0,45. Tento poměr je v postprandiální fázi ovlivněn vstupem chylomikronů do cirkulace - poměr chylomikron-C/chylomikron-TG je výrazně nižší, a Friedewaldovu rovnici tedy nelze použít.

Pokud stoupá koncentrace TG v plazmě je zvýšena výměna TG z TRL částic za estery cholesterolu z částic HDL a LDL katalyzovaná cholesterylester transferujícím proteinem (CETP). TG přenesené do LDL a HDL jsou poté hydrolyzovány působením jaterní lipázy (HTGL) a vznikají menší částice LDL a HDL (Patsch *et al.*, 1984). Vzniklé malé denzní („small dense“) LDL částice jsou více aterogenní, neboť snáze pronikají do cévní stěny a jsou náchylnější k oxidativnímu poškození. Přenos cholesterylesterů z částic HDL do částic remnantů je u člověka považován za součást reverzního transportu cholesterolu a je možné, že přibližně polovina cholesterolu je v reverzním transportu přenesena do jater touto drahou (Rader, 2006). Tyto změny hrají

významnou úlohu v metabolismu lipoproteinů, ale koncentrace cholesterolu v LDL a HDL částicích se v průběhu postprandiální lipémie výrazně nezmění.

Rozsah postprandiální lipémie se obvykle hodnotí jako plocha pod křivkou (AUC) nebo plocha pod přírůstkovou křivkou (AUC) koncentrace TG, koncentrace ultracentrifugačně izolovaných lipoproteinů, koncentrace apolipoproteinů B nebo koncentrace retinyl palmitátu (po podání vitamínu A s pokusnou zátěží) (Ooi *et al.*, 2011).

#### 1.4 Faktory ovlivňující postprandiální lipémii

Postprandiální lipémie může být ovlivněna mnoha faktory.

##### 1.4.1 Pohlaví

Postprandiální lipémie dosahuje vyšších hodnot u mužů než u žen (Cohn *et al.*, 1988). Tyto nálezy potvrdil Castro Cabezas a kol. v observační studii u 54 žen a 52 mužů, u kterých měřili kapilární triglyceridémii (TGc) v průběhu dne. Průměrná plocha pod křivkou (AUC) diurnální TGc byla nižší u žen než u mužů ( $16,50 \pm 4,85$  vs.  $23,44 \pm 6,5$  h mmol<sup>-1</sup>;  $p < 0,001$ ) a celkový denní energetický příjem byl také u žen nižší než u mužů (Castro Cabezas *et al.*, 2001).

U žen byl studován i vliv menstruačního cyklu na průběh postprandiální lipémie. Studie u 13 zdravých žen ukázala, že menstruační cyklus neovlivňuje průběh a rozsah postprandiální lipémie (Wendler *et al.*, 1992).

##### 1.4.2 Věk

Postprandiální lipémie je zvýšená u starších jedinců (Cohn *et al.*, 1988). Tento nález byl potvrzen ve studii, která ukázala, že starší probandi ( $\geq 50$  let,  $n = 31$ ) měli významně vyšší rozsah postprandiální lipémie, hodnocené jako AUC plazmatické koncentrace retinylesteru po podání vitamínu A, oproti mladším probandům ( $< 50$  let,  $n = 28$ ) (Krasinski *et al.*, 1990b).

##### 1.4.3 Fyzická aktivita

Aerobní cvičení významně redukuje postprandiální lipémii o 24–35 % a významně zvyšuje aktivitu LPL. Snížená lipemická odpověď po jídle bohatém na tuky souvisí s intenzitou a energetickým výdejem při fyzické aktivitě (Lopez-Miranda *et al.*, 2007). U vytrvalců je po orálním tukovém testu postprandiální lipémie snížena a clearance TRL částic je rychlejší než u netrénovaných jedinců (Gill *et al.*, 2001).

Trénovaní jedinci vykazují nižší hladinu plazmatických TG v lačném i v postprandiálním stavu (Hardman, 1998).

#### 1.4.4 Složení jednorázového pokusného jídla

Rozsah postprandiální lipémie je úměrný množství tuku v podaném pokusném jídle. Nízké dávky tuku (5–15 g) v pokusném jídle nevedou ke zvýšené postprandiální triglyceridémii. Takto malá dávka zřejmě nepřekročí kapacitu systému odstranit TG z cirkulace u normolipidemických subjektů. Při dávkách vyšších než 30 g tuku stoupá rozsah postprandiální lipémie úměrně velikosti tukové zátěže (Lairon & Defoort, 2011).

Rozsah postprandiální lipémie je ovlivněn i dalšími složkami experimentálního jídla. Například nahrazení glukózy fruktózou zvyšuje rozsah postprandiální lipémie. Podání fruktózy neindukuje výrazný nárůst v koncentraci inzulinu. Protože inzulin stimuluje aktivitu LPL v tukové tkáni, je možné, že je po podání fruktózy zpomalena clearance TRL (Chong *et al.*, 2007).

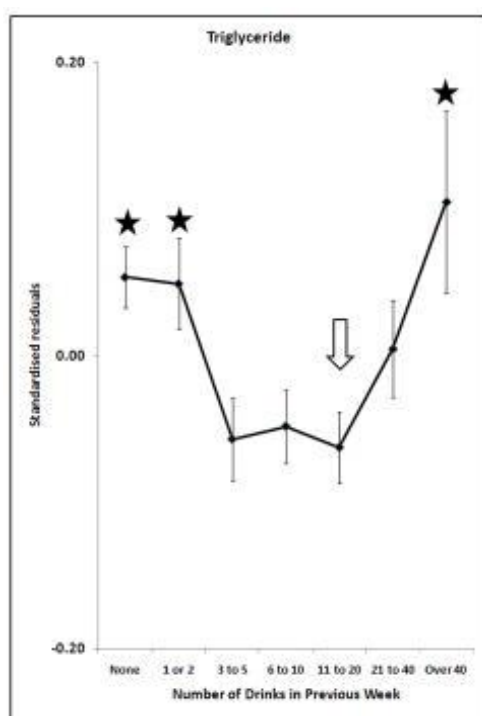
#### 1.4.5 Dlouhodobá dieta

Postprandiální lipémie je také závislá na složení jídla, které dlouhodobě konzumujeme. Například dlouhodobá konzumace diety obsahující tuky s vysokým obsahem omega-3 polynenasycených mastných kyselin, které jsou obsaženy v rybím oleji, je spojena s výrazně sníženou odpovědí triglyceridémie ve srovnání s dietou obsahující saturevané MK nebo omega-6 polynenasycené MK (Harris *et al.*, 1988). Dlouhodobá konzumace rybího oleje vede k významné redukci lačné i postprandiální koncentrace TG v plazmě.

#### 1.4.6 Alkohol

Alkohol podaný s jídlem významně zvyšuje koncentraci TG v postprandiálním stavu oproti kontrolnímu jídlu bez alkoholu (Fielding *et al.*, 2000). Obdobná data byla získána i pro ultracentrifugačně oddělené plazmatické TRL-TG a TRL-cholesterol, jejichž koncentrace v postprandiálním stavu byla rovněž významně zvýšena (Mudrakova *et al.*, 2013). Zvýšený rozsah postprandiální lipémie po podání alkoholu lze vysvětlit tím, že dojde k inhibici aktivity LPL. Toto zjištění bylo již dříve dokumentováno měřením aktivity LPL v post-heparinové plazmě (Nikkila *et al.*, 1978; Schneider *et al.*, 1985). Nám se tento nálezn podařilo jako prvním ověřit *in vivo*. Pomocí opakovaného intravenózního tukového tolerančního testu jsme prokázali, že akutní konzumace alkoholu snižuje aktivitu LPL *in vivo* (Zemankova *et al.*, 2015).

Dlouhodobě nízká (< 10 g alkoholu denně) konzumace alkoholu je asociována se sníženou diurnální triglyceridémií u mužů (Torres do Rego *et al.*, 2013). Tento nálezn je v souladu s jinými studiemi, ve kterých se uvádí, že nízká až umírněná konzumace alkoholu je asociována s poklesem plazmatické koncentrace TG. Recentní studie, která byla provedena na 8396 účastnících, ukázala, že vztah mezi konzumací alkoholu a triglyceridémií má tvar písmene J (Obr. 8). To znamená, že nejnižší koncentrace TG byla nalezena u lidí, kteří konzumovali 4–30 g alkoholu denně (Whitfield *et al.*, 2013).



**Obr. 8: Závislost triglyceridémie na množství konzumovaného alkoholu.**

Koncentrace triacylglycerolů (TG) je uvedena jako logaritmičsky transformovaná data. Výsledky jsou adjustovány na pohlaví, věk, BMI a kouření. Převzato z (Whitfield *et al.*, 2013).

Obdobné výsledky byly získány i v Copenhagen City Heart Study u 9584 účastníků, kde byla rovněž pozorována asociace ve tvaru písmene J mezi příjmem alkoholu a „non-fasting“ TG u žen ( $p = 0,006$ ), ale ne u mužů ( $p = 0,23$ ) (Tolstrup *et al.*, 2009). Je tedy zřejmé, že umírněná konzumace alkoholu je spojena s redukcí plazmatických TG a konzumace malého množství alkoholu denně (20 g a méně) může mít pozitivní efekt na triglyceridémii. Pokud křivka závislosti mezi konzumací alkoholu a triglyceridémií má tvar písmene J, pak vysoká nebo i velmi malá až žádná konzumace alkoholu nemá pozitivní vliv na koncentraci TG. To by mohlo vysvětlit nesrovnalosti mezi výsledky jednotlivých studií i zjištění, že meta-analýza 63 studií neprokázala významný vliv konzumace alkoholu na koncentraci TG (Brien *et al.*, 2011).

Pozitivní vliv dlouhodobé umírněné konzumace alkoholu na koncentraci TG lze vysvětlit zvýšenou aktivitou LPL a tedy zvýšenou „clearance“ TG z cirkulace. Bylo

prokázáno, že dlouhodobá umírněná konzumace alkoholu zvyšuje aktivitu LPL (Nishiwaki *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1985).

Vztahem mezi konzumací alkoholu a kardiovaskulárními onemocněními se zabývám v review, které je součástí předkládané práce.

#### 1.4.7 Genetické faktory

Rozsah postprandiální lipémie je ovlivněn mnoha geny a jejich polymorfismy, které se podílejí na lipidovém metabolismu. Jedná se např. o apolipoprotein E (*APOE*), lipoproteinovou lipázu (*LPL*) a apolipoprotein A5 (*APOA5*).

##### 1.4.7.1 Apolipoprotein E

Apolipoprotein E (apoE) se nachází na chylomikronech, remnantech chylomikronů, na VLDL a na některých částicích HDL. ApoE slouží jako ligand pro LDL receptor a pro „*LDL receptor-related protein*“ a tím napomáhá odstranění TRL částic z cirkulace. ApoE se tedy významně podílí na metabolismu plazmatických lipidů a transportu cholesterolu (Mahley *et al.*, 1984). U lidí byly popsány tři alely  $\epsilon 4$ ,  $\epsilon 3$  a  $\epsilon 2$ , které kódují tři izoformy apoE. Nejběžnější izoformou je apoE3, který má cystein v pozici 112 a arginin v pozici 158. Isoforma apoE4 má v pozici 112 i 158 arginin a je asociována se zvýšenou hladinou celkového cholesterolu oproti nejběžnější izoformě apoE3. Isoforma apoE2 má v pozici 112 i 158 cystein a nositelé alely  $\epsilon 2$  mají nižší hladinu cholesterolu než nositelé genotypu  $\epsilon 3\epsilon 3$  (Davignon *et al.*, 1988). U nositelů alely  $\epsilon 2$  byla nalezena významně vyšší lačná koncentrace TG než u nejběžnějšího genotypu  $\epsilon 3/\epsilon 3$ . Zároveň nositelé alely  $\epsilon 2$  a  $\epsilon 4$  vykazují zvýšenou postprandiální triglyceridémii (Irvin *et al.*, 2010).

##### 1.4.7.2 Lipoproteinová lipáza

Dosud byla popsána řada mutací v genu pro LPL, které jsou spojeny se ztrátou funkce enzymu. Deficit LPL způsobuje hromadění chylomikronů v cirkulaci a tím i nárůst koncentrace TG. Heterozygotní mutace v LPL, které jsou asociovány se sníženou aktivitou LPL nebo se ztrátou aktivity LPL, mohou zvyšovat riziko kombinované familiární hyperlipidémie a předčasné aterosklerózy (Merkel *et al.*, 2002). Heterozygotní pacienti s deficiencí v LPL mají sníženou aktivitu LPL a byl u nich pozorován více než dvojnásobně zvýšený rozsah postprandiální lipémie (Miesenbock *et al.*, 1993). Podle očekávání u pacientů s homozygotním deficitem LPL byla rovněž

nalezena významně vyšší postprandiální triglyceridémie než u zdravých kontrol (Carpentier *et al.*, 2012).

#### 1.4.7.3 Apolipoprotein A-V

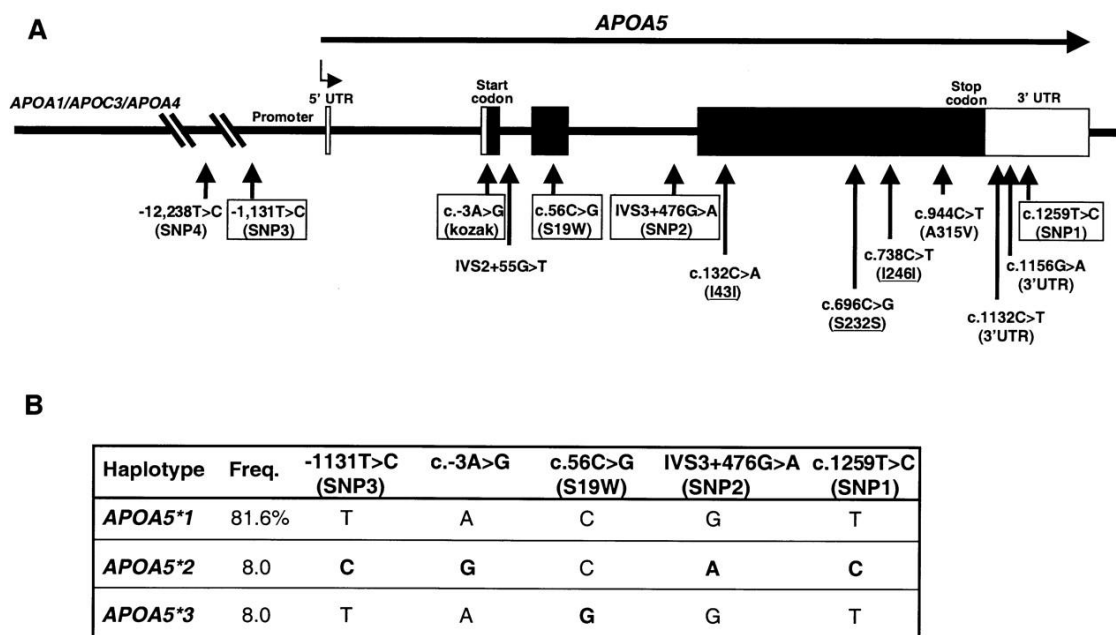
Jedním z významných proteinů, které ovlivňují hladinu TG je apolipoprotein A-V (apoA-V). Gen pro apoA-V (*APOA5*) byl objeven v roce 2001 nezávisle na sobě dvěma skupinami. Pennacchio a kol. odhalili *APOA5* pomocí komparativního sekvenování lidské a myší DNA (Pennacchio *et al.*, 2001). Van der Vliet a kol. použitím subtraktivní hybridizace cDNA objevili gen, který je upregulován v rané fázi regenerace jater u potkanů. Kódovaný protein byl exprimován pouze v játrech a byl označen jako apoA-V (van der Vliet *et al.*, 2001).

*APOA5* se nachází na delším raménku 11. chromozómu (11q23), v blízkosti genového clusteru *APOA1/CIII/AIV*. Transgenní myši exprimující lidský *APOA5* měly třikrát nižší plazmatickou koncentraci TG. Naproti tomu, „knock-out“ myši, kterým chyběl *apoA5*, měly čtyřikrát vyšší koncentraci plazmatických TG než kontrolní zvířata (Pennacchio *et al.*, 2001).

ApoA-V je syntetizován v játrech, kde vzniká preprotein skládající se z 366 aminokyselin (AK). Následně dochází k intracelulárnímu odštěpení signálního peptidu (23 AK) a maturovaný apoA-V (343 AK) je v plazmě asociován s VLDL a HDL částicemi (O'Brien *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2012).

U lidí byly popsány tři běžné haplotypy *APOA5* (Obr. 9) – haplotyp 1 („wild-type“ *APOA5\*1*), haplotyp 2 (*APOA5\*2*), který se nachází v promotoru genu a obsahuje 4 jednonukleotidové polymorfismy (SNP) (rs662799: -1131T>C, rs651821: -3A>G, rs2072560: 751A>G a rs2266788: 891T>C), a haplotyp 3 (*APOA5\*3*) (rs3135506: 56C>G), který je spojen se záměnou serinu za tryptofan v pozici 19. Haplotypy 2 a 3 jsou nezávisle asociovány se zvýšenou hladinou plazmatických TG a těžkou hypertriglyceridémií (Pennacchio *et al.*, 2001; Pennacchio *et al.*, 2002; Vrablik *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2008).

Některé studie prokázaly zvýšenou postprandiální lipémii u nositelů haplotypů 2 a 3 (Jang *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2006), jiní autoři tento nález nepotvrdili (Martin *et al.*, 2003; Masana *et al.*, 2003).



Obr. 9: Schéma genu *APOA5* (A) a jeho haplotypů (B).

A) Genomová struktura *APOA5* a lokalizace polymorfismů. Gen je transkribován zleva doprava, jak ukazuje horizontální šipka. Exony jsou zobrazeny jako černé čtverečky. Vertikálními šipkami jsou označeny pozice jednotlivých jednonukleotidových polymorfismů (SNP).

B) Relativní frekvence běžných haplotypů *APOA5* u 419 bělochů (Berkeley Lipid Study Population).  
Převzato z (Pennacchio *et al.*, 2002).

### 1.4.8 Terapie

Prvotním léčebným postupem u pacientů s hypertriglyceridemií je změna životosprávy, a to především snížení tělesné hmotnosti a zvýšení fyzické aktivity. Pacienti by měli omezit příjem jednoduchých cukrů a nasycených mastných kyselin. Tyto nelékové intervence by měly příznivě ovlivnit triglyceridémii i rozsah postprandiální lipémie.

Postprandiální lipémii může ovlivnit také farmakoterapie. Fibráty, léky, které jako agonisté receptorů aktivovaných peroxizómovými proliferátory  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) receptorů přímo ovlivňují metabolismus TG, snižují rozsah postprandiální lipémie (Kolovou *et al.*, 2008). Průběh postprandiální lipémie ale příznivě ovlivňují i statiny – inhibitory syntézy cholesterolu (Kolovou *et al.*, 2007). Nově bylo ukázáno, že příznivý vliv na postprandiální lipémii má i ezetimib - specifický inhibitor absorpce cholesterolu ze střeva. V japonské studii Kikuchi a kol. ukázali, že užívání ezetimibu po dobu 4 týdnů významně snížilo postprandiální triglyceridémii v séru (AUC TG bylo nižší o 26,9 %) (Kikuchi *et al.*, 2012).

## 1.5 Metody testování postprandiální lipémie

Postprandiální lipémii lze testovat několika způsoby, přičemž každá metoda měření má své limity. Při testování postprandiální lipémie se zabýváme třemi hlavními aspekty.

Prvním aspektem je samotná tuková zátěž, tedy složení experimentálního jídla. V některých studiích byla použita pouze čistě tuková zátěž, přičemž klasickým experimentálním jídlem je šlehačka. Konzumace šlehačky umožňuje podání vysokého množství tuku v relativně malém objemu. Samotná šlehačka obsahuje minimální množství cukru a neindukuje významnou inzulinovou odpověď. Nelze však opomenout, že konzumace čistě tukové zátěže není fyziologická a prakticky nikdo nekonzumuje čistě tukové jídlo. V jiných studiích bylo použito tzv. „*mixed meal*“, neboli složené jídlo, které obsahuje tuky, sacharidy a proteiny v různém poměru a snaží se napodobit přirozenou stravu. Nutno vzít v úvahu, že přítomnost sacharidů a proteinů v jídle může ovlivnit samotnou absorpci tuku a zároveň zasahuje do regulace metabolických reakcí, které přispívají k variabilitě v postprandiální triglyceridémii.

Druhým, neméně důležitým aspektem, je délka testování, respektive po jakou dobu po konzumaci tukové zátěže měřit koncentraci plazmatických TG a dalších sledovaných parametrů. Studie, které se zabývají testováním postprandiální lipémie, sledují lipidové parametry po dobu dvou až osmi hodin. Maximálního vzestupu koncentrace TG je dosahováno 3–4 hodiny po podání tukové zátěže. Meta-analýza 113 klinických studií ukázala, že koncentrace plazmatických TG 4 hodiny po tukovém zátěžovém testu reprezentuje nejlépe odpověď postprandiální lipémie (Mihas *et al.*, 2011). Je tomu tak zřejmě proto, že u všech osob se blíží v této době k nejvyšším hodnotám. Měření TG 4 hodiny po tukovém tolerančním testu je pro klinické účely i nejpraktičtější vzhledem k časovým možnostem pacientů. U pacientů se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních onemocnění, kteří vykazují opožděné maximum postprandiální triglyceridémie, by však tato doba nemusela postačovat. Tyto pacienty by bylo vhodnější vyšetřovat po 6–8 hodinách po tukovém zátěžovém testu, v době, kdy u zdravých jedinců je triglyceridémie již normalizována.

Třetím významným aspektem je to, co měříme. Lze stanovit koncentraci lipidů, lipoproteinů nebo jejich proteinových komponent nebo lze využít jiných markerů transportovaných lipoproteiny (retinyl palmitát).



### 1.5.1 Stanovení lipidů

Nejjednodušší způsob testování postprandiální lipémie je vyšetření koncentrace plazmatických TG. Vzestup koncentrace TG po dostatečně vysoké tukové zátěži je nejvýraznější změnou charakteristickou pro postprandiální fázi. Přímé biochemické stanovení koncentrace TG je jednoduché, snadno dostupné a levné. Pro rutinní klinickou praxi by měření koncentrace TG pro hodnocení postprandiální lipémie po tukovém tolerančním testu mohlo být nejvhodnější (Kolovou *et al.*, 2011). Nevýhodou stanovení plazmatických TG je to, že nezískáme žádné informace o povaze a původu částic zodpovědných za vzestup triglyceridémie.

V řadě studií byly sledovány i změny celkového cholesterolu a cholesterolu v LDL a HDL. V průběhu postprandiální lipémie se ovšem jejich koncentrace prakticky nemění, a proto nejsou obvykle sledovány (Lairon *et al.*, 2007; Sidhu & Naugler, 2012).

### 1.5.2 Stanovení lipoproteinů

#### 1.5.2.1 Separace lipoproteinů

TG jsou v plazmě transportovány lipoproteiny označovanými jako lipoproteiny bohaté na TG (TRL = „*triglyceride rich lipoproteins*“). Jde o lipoproteiny o hustotě nižší než 1,006 g/ml, velké částice mají dokonce nižší hustotu než je hustota vody.

Základní metodou pro izolaci a charakterizaci lipoproteinů je ultracentrifugace, což je fyzikální metoda separace lipoproteinů na základě jejich rozdílné hustoty. Lipoproteiny o hustotě nižší, než je hustota roztoku, flotují a lze je separovat. TRL částice flotují při hustotě 1,006 g/ml, která odpovídá hustotě fyziologického roztoku. Sekvenční ultracentrifugace probíhá při 105 000 g (Havel *et al.*, 1955) po min. 18 hodin. Z plazmy odebrané na lačno můžeme izolovat VLDL, zatímco v plazmě odebrané v postprandiálním stavu izolujeme frakci s TRL lipoproteiny, ve které nelze rozlišit chylomikrony a VLDL částice. V TRL frakci lze stanovit koncentraci triacylglycerolů (TRL-TG) a cholesterolu (TRL-C). U lipoproteinů můžeme také charakterizovat obsah fosfolipidů a proteinů, případně můžeme určit detailní spektrum mastných kyselin v jednotlivých lipidových třídách, koncentraci jednotlivých apolipoproteinů apod. Pro izolaci velkých částic chylomikronů lze rovněž použít metody gradientové ultracentrifugace (Karpe *et al.*, 1995).

Výhodou metody je, že se jedná o nejspolehlivější způsob izolace TRL frakce. Následně můžeme charakterizovat i složení dalších lipoproteinů - IDL, LDL a HDL. Významné změny koncentrace a složení však lze detekovat pouze v IDL frakci.

Podobně jako při stanovení koncentrace TG v plazmě nelze pouze stanovením koncentrace TG v těchto lipoproteinech zjistit původ TG. Odlišit příspěvek střevních a jaterních lipoproteinů lze stanovením koncentrace apoB-48 a apoB-100 v izolované TRL frakci (Kotite *et al.*, 1995).

Nevýhodou této metody je náročnost na vybavení (ultracentrifuga) a relativně dlouhá doba ultracentrifugace (18 hodin).

K separaci lipoproteinů lze rovněž použít chromatografické metody (např. HPLC), které dělí lipoproteiny na základě jejich velikosti (Marz *et al.*, 1993; Okazaki *et al.*, 1983). Při těchto metodách se používají podstatně menší objemy plazmy nebo séra, a jsou tedy používány především v experimentech na myších modelech. Určitou nevýhodou je méně spolehlivá kvantifikace lipidů v izolovaných subfrakcích.

#### 1.5.2.2 Rozlišení původu lipoproteinů pomocí specifických markerů

Apolipoprotein B-48 (apoB-48) se u člověka nachází výhradně na lipoproteinech intestinálního původu - tedy chylomikronů a jejich remnantů. ApoB-48 není transferován na jiné lipoproteiny a není secernován játry. Na jednu částici chylomikronu připadá jeden apolipoprotein B-48. ApoB-48 tedy může sloužit jako dobrý indikátor počtu částic intestinálního původu.

Apolipoprotein B-100 (apoB-100) je u člověka přítomen na lipoproteinech, které jsou jaterního původu - tedy VLDL a z nich vzniklé LDL. Na jednu částici VLDL, respektive LDL, připadá jedna molekula apoB-100. Sérová koncentrace apoB-100 tedy reflektuje celkový počet VLDL a LDL částic v séru.

Při stanovení apoB-48 a apoB-100 musíme brát v úvahu to, že tyto apolipoproteiny jsou produkty stejného genu (Cladaras *et al.*, 1986) a mají shodný N-konec (velikost apoB-48 odpovídá 48 % velikosti apoB-100). Při stanovení apoB-48 tedy musíme použít protilátku specifickou proti C-konci apoB-48. To představuje zásadní metodický problém, neboť protilátka nesmí vázat apoB-100.

Vedle imunochemických metod lze pro stanovení apoB-100 a apoB-48 v TRL použít denaturující gradientovou polyakrylamidovou elektroforézu (SDS PAGE) (Karpe & Hamsten, 1994; Kotite *et al.*, 1995).

Při studiu postprandiální lze apoB-100 měřit pouze v TRL frakci, protože více jak 90 % apoB-100 je v LDL částicích a měření apoB-100 v plazmě tedy není schopno odlišit příspěvek apoB-100 v TRL. ApoB-48 lze měřit v plazmě i v TRL. Měření

koncentrace apoB-48 a apoB-100 umožňuje posouzení změny v koncentraci částic endogenního a exogenního původu. Nevýhodou je, že vyžaduje ultracentrifugaci.

### 1.5.3 Stanovení retinylpalmitátu

Pro značení chylomikronů při studiu postprandiální lipémie se používá metoda využívající retinylpalmitát. Bez suplementace vitaminem A je totiž koncentrace retinylpalmitátu v chylomikronech velmi nízká. Při této metodě se spolu s experimentálním jídlem podává vitamin A, který je po vstřebání ve střevní sliznici esterifikován na retinylester - primárně na retinylpalmitát a ten je inkorporován do chylomikronů, které se pomocí lymfatického systému dostávají do cirkulace. Retinylpalmitát je tedy markerem hydrofobního jádra chylomikronů a jejich remnantů (Ruotolo *et al.*, 1992).

Výhodou této metody je označení TRL částic intestinálního původu přirozenou látkou (vitamin A), která je tělu vlastní. Koncentrace retinylpalmitátu tedy odráží koncentraci chylomikronů a především jejich remnantů v průběhu postprandiální fáze. Tomu odpovídá i nález, že koncentrace retinylesteru dosáhla maxima později než koncentrace plazmatických TG, což reflektuje hromadění remnantů v pozdní fázi postprandiální lipémie (Krasinski *et al.*, 1990a). K odlišení příspěvku částic transportujících dietní TG v postprandiální fázi není tedy zapotřebí ultracentrifugační separace.

Nevýhodou této metody je použití HPLC pro stanovení retinylpalmitátu.

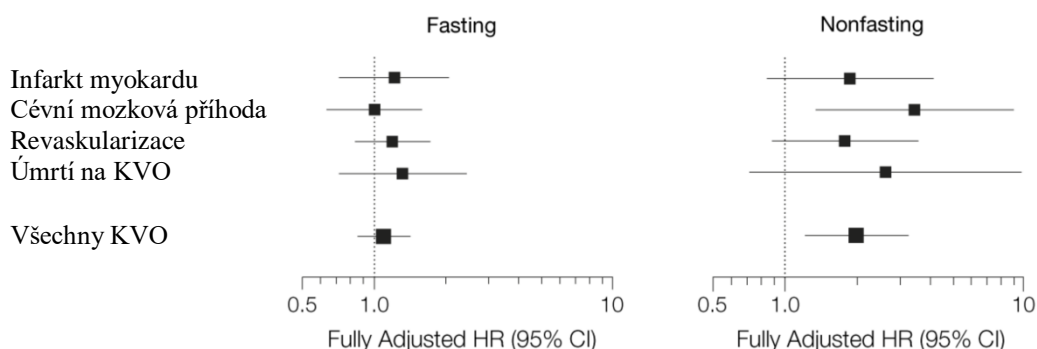
### 1.6 Postprandiální lipémie a ateroskleróza

V roce 1979 Zilversmit jako první vyslovil hypotézu, že aterogeneze je postprandiální fenomén a je způsobena chylomikrony a jejich remnanty. Poukázal na potřebu studia těchto částic a jejich metabolismu k nalezení účinné prevence proti aterosklerotickým procesům (Zilversmit, 1979).

Chylomikrony, vzhledem k své velikosti, nejsou schopny proniknout do subendoteliálního prostoru. Naproti tomu remnanty, VLDL a IDL do cévní stěny mohou prostupovat a přispět k aterosklerotickému poškození cév. To, že se v cévní stěně mohou ukládat i remnanty, prokázali Rapp a kol., kteří z lidských aterosklerotických plátů vyizolovali lipoproteiny obsahující apoB-48 (Rapp *et al.*, 1994). Aterogenní potenciál TRL vyplývá z toho, že částice VLDL, IDL i remnantů nesou více cholesterolu než částice LDL. Zvýšená postprandiální triglyceridémie je spojena s vyšší produkcí malých denzních LDL, které jsou více aterogenní.

Před 20 lety meta-analýza 17 prospektivních populačních studií na více než 57 200 jedinců poprvé identifikovala TG jako nezávislý rizikový faktor srdečně-cévních onemocnění. Podle této studie vzestup plazmatické hladiny lačných TG o 1 mmol/l zvyšuje riziko kardiovaskulárního onemocnění o 32 % u mužů a o 76 % u žen (Hokanson & Austin, 1996).

Z praktických důvodů (neboť ne vždy je možné stanovit koncentraci TG na lačno) se začalo používat i stanovení tzv. „*non-fasting*“ TG, tedy koncentrace TG, která je měřena kdykoliv v průběhu dne a nevyžaduje lačnění. Zhruba před 10 lety bylo v rozsáhlé studii u amerických žen – American Women's Health Study – prokázáno, že i vyšší hladina „*non-fasting*“ TG (a nikoli TG stanovených nalačno) je silně asociována se zvýšeným rizikem budoucích kardiovaskulárních příhod nezávisle na hladině ostatních lipidů (Obr. 10) (Bansal *et al.*, 2007).



**Obr. 10: Vztah hladiny TG k jednotlivým kardiovaskulárním událostem.**

Data z americké Women's Health Study ukazují, že koncentrace triacylglycerolů (TG) měřená v průběhu dne, nikoli nalačno, je pravděpodobně výrazněji asociována s rizikem kardiovaskulárního onemocnění. Pacienti se zvýšenými lačnými TG nemají riziko zvýšené. U „*non-fasting*“ TG je riziko kardiovaskulárního onemocnění zhruba dvojnásobné. Relativní riziko (HR) a 95% konfidenční interval nejvyšší vs. nejnižší tercily hladiny TG. Hodnoty byly adjustovány na věk, tlak krve, kouření, užívání hormonů, hladinu celkového a HDL cholesterolu, diabetes mellitus, indexu tělesné hmotnosti (BMI) a hladinu vysoko-senzitivního C-reaktivního proteinu.

Převzato z (Bansal *et al.*, 2007).

Do této studie bylo zahrnuto více než 26 000 zdravých žen, které byly sledovány po dobu 11 let, a bylo u nich vyhodnoceno riziko kardiovaskulárních příhod. Tato studie ukázala, že koncentrace HDL-cholesterolu a TG měřena v postprandiálním stavu predikuje výskyt kardiovaskulárního onemocnění. Lačná i postprandiální koncentrace TG byla asociována s rizikem kardiovaskulárních příhod. Po adjustaci na další rizikové faktory, pouze „*non-fasting*“ TG vykazovaly silný nezávislý vztah s rizikem kardiovaskulárních onemocnění. Naopak koncentrace LDL a celkového cholesterolu

měřená v postprandiálním stavu měla menší vypovídající hodnotu o kardiovaskulárním onemocnění (Mora *et al.*, 2008).

Podobné výsledky byly získány i v Copenhagen City Heart Study, ve které bylo po dobu 26 let sledováno 13 981 osob. V této studii bylo také nalezeno, že „non-fasting“ TG jsou asociovány s rizikem kardiovaskulární příhody (pro obě pohlaví). Bylo ukázáno, že „non-fasting“ TG  $\geq 5$  mmol/l predikují 17x vyšší riziko infarktu myokardu u žen a 5x vyšší riziko u mužů (Nordestgaard *et al.*, 2007).

Nevýhodou studií používajících koncentraci „non-fasting“ TG je skutečnost, že není jednoznačně definováno množství jídla, respektive tuku, které bylo konzumováno, dlouhodobá dieta, fyzická zátěž a konzumace alkoholu.

V souladu s výsledky výše zmíněných studií jsou práce, které se přímo zabývaly studiem postprandiální lipémie. Bylo ukázáno, že postprandiální lipémie je zvýšená a prolongovaná u osob s ischemickou chorobou srdeční prokázanou koronograficky (Patsch *et al.*, 1992). Několik dalších klinických studií ukázalo vztah mezi aterosklerózou a zpožděnou eliminací TRL částic a také vztah mezi postprandiální lipémií a následnou progresí aterosklerózy u pacientů se srdečně-cévním onemocněním. Kardiovaskulární onemocnění dokumentované koronární angiografií je asociováno s vyšší postprandiální hypertriglyceridémií (Groot *et al.*, 1991; Meyer *et al.*, 1996). Analogické výsledky byly získány ve studiích, které jako marker aterosklerózy použily měření tloušťky intimy-medie karotid. V těchto studiích byla zjištěna pozitivní asociace mezi tloušťkou intimy-medie a rozsahem postprandiální lipémie (Hamsten *et al.*, 2005; Karpe *et al.*, 1998). Prolongovaná postprandiální hypertriglyceridémie byla nalezena i u mladých zdravých mužů, u jejichž otců byla diagnostikována ischemická choroba srdeční (Tiret *et al.*, 2000; Uiterwaal *et al.*, 1994). Zvýšené familiární riziko onemocnění koronárních tepen u mladých mužů by tedy mohlo souviset se změnami v metabolismu postprandiálních lipoproteinů.

Nálezy z výše uvedených studií naznačují, že koncentrace postprandiálních TG může sloužit jako spolehlivější prediktor kardiovaskulárního rizika než koncentrace TG měřená na lačno. Pokud tedy většinu dne strávíme v postprandiálním stavu, měla by být úloze postprandiální triglyceridémie v patogenezi kardiovaskulárních onemocnění věnována zvýšená pozornost.

## 1.7 Testování postprandiální lipémie v klinické praxi

Z výše uvedeného je zřejmé, že zvýšená a prolongovaná postprandiální lipémie hraje významnou úlohu v patogenezi kardiovaskulárních onemocnění. I když se zdá, že stanovení „*non-fasting*“ TG lze využít pro odhad rizika těchto onemocnění, bylo by vhodné mít k dispozici jednoduchý a standardizovaný zátěžový tukový test analogický ke glukózovému tolerančnímu testu. Běžně používané protokoly, které se pro studium postprandiální lipémie používají, se liší v délce trvání a složení experimentálního jídla a jsou pro svou časovou a často i technickou náročnost v rutinní praxi nevhodné.

Tento problém se pokusil překonat mezinárodní panel vědců a kliniků, který se sešel v roce 2010 v Athénách. Tento panel expertů zvážil význam postprandiální triglyceridémie a její roli jako rizikového faktoru pro kardiovaskulární onemocnění. Na základě tohoto setkání a meta-analýzy řady studií byl v roce 2011 připraven návrh standardizovaného testu, který by byl snadno proveditelný v běžné praxi, a byla stanovena série klinických doporučení:

1. Zvýšená hladina „*non-fasting*“ TG je rizikovým faktorem pro kardiovaskulární onemocnění.
2. Požadovaná koncentrace „*non-fasting*“ TG je  $< 2$  mmol/l.
3. Standardizovaný test postprandiální lipémie má být proveden po 8 hodinovém lačnění a měl by se skládat ze 75 g tuku, 25 g sacharidů a 10 g proteinu.
4. Měření koncentrace TG by mělo být provedeno 4 hodiny po tukovém tolerančním testu.
5. Preferenčně by pomocí tukového tolerančního testu měly být testovány osoby s lačnou koncentrací TG v rozmezí 1–2 mmol/l.
6. Koncentrace TG  $\leq 2,5$  mmol/l po tukovém tolerančním testu je adekvátní.
7. Vyšší a tím pádem nežádoucí odpověď postprandiálních TG by měla být léčena zásadní změnou životního stylu a podáním vhodných léků na snížení koncentrace TG – statiny, fibráty a kyselina nikotinová (Kolovou *et al.*, 2011).

Vyšetření postprandiální lipémie by nemělo být prováděno plošně, ale pouze u pacientů s hraničním rizikem, u kterých je nutné rozhodnout, zda terapeuticky intervenovat nebo nikoli.

## **2. Cíle práce**

1. Ve studiích u zdravých dobrovolníků bylo cílem práce analyzovat úlohu nutričních a genetických faktorů, které ovlivňují rozsah postprandiální lipémie.

A) U zdravých dobrovolníků analyzovat úlohu sacharidů, které jsou s tuky obvykle konzumovány, v určení rozsahu postprandiální lipémie. Zjistit zda přidavek glukózy, který indukuje odpověď inzulínu, k čisté tukové zátěži ovlivní rozsah postprandiální lipémie.

B) Ve stejném souboru zdravých dobrovolníků analyzovat úlohu variant v genu kódujícího apolipoprotein A-V (*APOA5*) v určení rozsahu postprandiální lipémie.

2. Zjistit, zda je u pacientů zvýšený rozsah postprandiální lipémie (hodnocený pomocí testu vycházejícího z doporučení mezinárodního panelu (Kolovou *et al.*, 2011) prediktorem rozsahu aterosklerotického postižení posuzovaného několika nezávislými testy (kalciové skóre, IMT, tepenná tuhost a endoteliální dysfunkce).

### 3. Vliv glukózy na průběh postprandiální lipémie

#### 3.1 Úvod

Při odhadu kardiovaskulárního rizika metodou SCORE je určováno 5 základních faktorů, kterými jsou věk, pohlaví, kouření, hodnota systolického tlaku a hodnota celkového cholesterolu. Vedle stanovení těchto klasických rizikových faktorů by bylo dobré mít k dispozici test, který pomůže dále stratifikovat pacienty s hraničním rizikem. V posledních letech bylo opakovaně prokázáno, že zvýšená postprandiální lipémie je rizikovým faktorem kardiovaskulárních onemocnění (KVO) a její stanovení by mohlo ke stratifikaci pacientů přispět (Bansal *et al.*, 2007; Mora *et al.*, 2008; Nordestgaard *et al.*, 2007). Bylo by tedy optimální identifikovat jedince se zvýšeným rizikem kardiovaskulárního onemocnění pomocí tukového zátěžového testu – analogického ke glukózovému tolerančnímu testu. Testování postprandiální lipémie ale doposud není zavedeno v klinické praxi a to proto, že zde není standardizovaný protokol pro její testování. Doposud se pro testování postprandiální lipémie používaly různé protokoly, které se lišily v délce trvání a ve složení experimentálního jídla. Jak již bylo zmíněno výše, na základě metaanalýzy řady studií byl v roce 2011 připraven návrh standardizovaného testu, který by byl snadno proveditelný v běžné praxi. V doporučeném testu je pacientům podáno 75 g tuku, 25 g cukru a 10 g proteinu. Koncentrace triacylglycerolů je stanovena před a 4 hodiny po podání pokusné snídani. Při přípravě tohoto doporučení byla otázka obsahu sacharidů v pokusném jídle předmětem dlouhé diskuze (Kovář J, osobní sdělení). Glukóza totiž indukuje odpověď inzulinu, který sám o sobě ovlivňuje celou řadu parametrů, které mají dopad na rozsah postprandiální lipémie. Sekrece inzulinu inhibuje lipolýzu v tukové tkáni a ovlivňuje aktivitu LPL tak, aby TG v chylomikronech byly preferenčně hydrolyzovány LPL tukové tkáně a docházelo k vychytávání MK adipocyty (Goldberg *et al.*, 2009; Kersten, 2014). Současně klesá aktivita LPL ve svalech, které v této době přednostně využívají glukózu jako zdroj energie.

Podání samotné tukové zátěže rovněž indukuje sekreci inzulinu, ale tento efekt je zanedbatelný v porovnání s inzulinémií navozenou podáním glukózy (Nolan *et al.*, 2006). Na sekreci inzulinu se podílí i inkretin glukagonu podobný peptid 1 (GLP-1) tím, že stimuluje na glukóze závislou („*glucose-dependent*“) sekreci inzulinu. Nedávno bylo ukázáno, že i inkretiny mohou ovlivnit průběh postprandiální lipémie (Hein *et al.*, 2013).



Glukagonu podobný peptid (GLP-1) se skládá z 30 aminokyselin a je produkován endokrinními L-buňkami ve střevě. GLP-1 je produktem genu pro glukagon. Prvotní produkt translace proglukagonu je štěpen pomocí enzymu prohormonální konvertázy a dochází ke vzniku GLP-1. Plazmatická hladina GLP-1 roste 10–15 minut po jídle a dosahuje maxima (15–50 pmol/l) během 40 minut. Sekrece GLP-1 je stimulována přítomností nutrientů v lumen střeva a pravděpodobně zde fungují také nervové a endokrinní mechanismy (Holst, 2007; Holst & Gromada, 2004). GLP-1 je inkretin, to znamená, že způsobuje zvýšenou sekreci inzulínu a sníženou sekreci glukagonu v Langerhansových ostrůvcích pankreatu. Přesněji řečeno, GLP-1 stimuluje glukózově závislou („*glucose-dependent*“) sekreci inzulínu a je důležitý pro udržení glukózové homeostázy. GLP-1 stimuluje sekreci inzulínu prostřednictvím aktivace specifických receptorů spřažených s G-proteinem, které jsou exprimovány přímo na  $\beta$  buňkách ostrůvků pankreatu (Drucker, 2006; Holz, 2004). Bioaktivní GLP-1 se tvoří z GLP-1(1-37) a existuje ve dvou ekvivalentních cirkulujících formách, GLP1(7-37) a GLP-1(7-36), přičemž hlavní formou je GLP-1(7-36). GLP-1 je rychle degradováno dipeptidylpeptidázou-4 (DPP-4) na GLP-1(9-36) nebo GLP-1(9-37). Poločas rozpadu bioaktivního GLP-1 v cirkulaci je méně než 2 minuty. Degradace GLP-1 je pravděpodobně tak rychlá, že podstatná část imunoreaktivního GLP-1 v portální a systémové cirkulaci byla již štěpena DPP-4 (Baggio & Drucker, 2007).

V běžném jídelníčku jsou tuky vždy konzumovány se sacharidy, které jsou primárním faktorem indukujícím sekreci inkretinů a inzulínu. Inzulín je primárním regulátorem „přestavby“ metabolismu na příjem energie z potravy. Není ovšem zcela jasné, jak tato metabolická „přestavba“ ovlivní průběh postprandiální lipémie. Je otázkou, zda i přidání relativně malého množství glukózy k tukové zátěži, které bude indukovat inzulínovou odpověď, ovlivní rozsah a průběh postprandiální lipémie.

Prvním cílem mé práce bylo tedy analyzovat úlohu glukózy přidané k tukové zátěži na vybrané parametry postprandiální lipémie. Zároveň byl analyzován vliv podané glukózy na koncentraci GLP-1, který významně ovlivňuje regulaci sekrece hormonů pankreatu.

## 3.2 Materiál a metody

### 3.2.1 Uspořádání experimentu u zdravých dobrovolníků

Studie byla provedena u 30 zdravých mužů (věk  $34,0 \pm 8,2$  let; BMI:  $26,1 \pm 3,2$  kg/m<sup>2</sup>). Dobrovolníci byli informováni o rizicích spojených s odběry krve a podáním heparinu a podepsali informovaný souhlas schválený etickou komisí Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM) a Thomayerovy nemocnice v Praze. Před zařazením do studie bylo u dobrovolníků provedeno kontrolní vyšetření, při kterém byla stanovena hladina triacylglycerolů. Do studie byli zařazeni dobrovolníci, jejichž hladina TG v krvi byla nižší než 2,5 mmol/l.

V rámci studie každý dobrovolník absolvoval 2 vyšetření postprandiální lipémie. V jednom vyšetření mu byla podána experimentální snídaně obsahující 75 g tuku (225 ml 30% šlehačky Meggle) a 25 g glukózy (T+G snídaně; 3240 kJ). V druhém vyšetření dobrovolník obdržel experimentální snídani obsahující pouze 75 g tuku (T snídaně; 2830 kJ). Vyšetření byla prováděna v Laboratoři pro výzkum aterosklerózy, IKEM.

Pro opakované odběry krve byla na začátku vyšetření dobrovolníkům zavedena kanyla do žíly v loketní jamce a byl proveden první odběr krve (čas 0 minut). Následně byla podána experimentální snídaně, kterou všichni dobrovolníci zkonsumovali během 5 minut. Další odběry krve byly provedeny v časech 30, 60, 90, 120, 240, 360 a 480 minut po podání experimentální snídaně. Po skončení pokusu byl dobrovolníkům aplikován heparin (100 UI/kg hmotnosti; Léčiva, Praha, Česká Republika) a 10 minut po aplikaci heparinu byl odebrán poslední vzorek krve.

Odstup mezi jednotlivými vyšetření byl minimálně 1 týden. Dobrovolníci byli poučeni, aby se 24 hodin před experimentem vyvarovali konzumace alkoholu a den před experimentem zkonsumovali poslední jídlo před devátou hodinou večer. V průběhu vyšetření dobrovolníci setrvali v klidu, nekonsumovali žádné jídlo a mohli pít pouze vodu. Pořadí obou vyšetření bylo randomizováno. Polovina dobrovolníků zahájila studii konzumací tuku a glukózy, druhá polovina konzumací samotného tuku.

Vzorky krve byly odebírány do zkumavek s EDTA (Greiner Bio-One, Rakousko) a ihned byly umístěny do lázně voda-led. K alikvotům krve pro stanovení aktivního GLP-1 byl přidán DPP-IV inhibitor (EMD Millipore, USA). Post-heparinová plazma byla odebírána do zkumavek s heparinem (Greiner Bio-One, Rakousko).

Odebrané vzorky krve byly centrifugovány (15 min, 3 000x g, 4 °C; centrifuga Allegra X-12R, Beckman Coulter, USA). V den experimentu byly stanoveny koncentrace TG, cholesterolu, HDL-cholesterolu, LDL-cholesterolu, glukózy a neesterifikovaných mastných kyselin (NEMK). Alikvoty plazmy pro měření dalších parametrů byly uchovány v -80 °C. Z těchto vzorků byly stanoveny koncentrace inzulinu a apolipoproteinu B-48. Koncentrace aktivního a celkového GLP-1 byly stanoveny v plazmě získané z krve s přidaným inhibitorem DPP-IV. Koncentrace lipoproteinové lipázy (LPL) byla stanovena v post-heparinové plazmě. Ze vzorků odebraných v časech 0, 60, 120, 240, 360 a 480 minut byly ultracentrifugací (při hustotě  $d = 1,006$  g/ml) izolovány a charakterizovány lipoproteiny bohaté na triacylglyceroly (TRL). V TRL frakci byla stanovena koncentrace triacylglycerolů (TRL-TG), cholesterolu (TRL-C), apolipoproteinu B-48 a apolipoproteinu B-100.

### **3.2.2 Stanovení lipidů, glukózy a NEMK**

Koncentrace TG, celkového cholesterolu, NEMK, TRL-TG a TRL-C byly stanoveny enzymatickými metodami na analyzátoru Hitachi 902 Automatic analyzer (Roche, Mannheim, Německo), glukóza byla stanovena na analyzátoru Cobas Mira Plus (Roche, Mannheim, Německo) v Lipidové laboratoři IKEM. Pro stanovení TG byl použit kit Triglycerides GPO-PAP, pro stanovení cholesterolu kit Cholesterol CHOD-PAP, pro stanovení HDL-cholesterolu kit HDL-Cholesterol 3rd generation, pro stanovení LDL-cholesterolu kit LDL-Cholesterol 2nd generation - všechny kity od firmy Roche/Hitachi (Německo). Pro stanovení glukózy byl použit kit Glu God Glukosa GOD 1500 od firmy Erba Lachema, Česká republika) a pro stanovení NEMK kit NEFA-HR (2)R1 Set od firmy Wako Chemicals (Německo).

### **3.2.3 Ultracentrifugace**

Ultracentrifugace rozdělí lipoproteiny na základě jejich rozdílné hustoty. VLDL a TRL částice lze oddělit při hustotě 1,006 g/ml, což je hustota fyziologického roztoku (Havel *et al.*, 1955).

Do ultracentrifugační zkušební zkumavky (Beckman) bylo napipetováno 5 ml plazmy. Zkušební zkumavka byla doplněna fyziologickým roztokem do celkového objemu 6,5 ml a uzavřena. Vzorky byly ultracentrifugovány v rotoru 50.4Ti při 39 000 rpm, 8 °C, po dobu 18 hodin (Ultracentrifuga LE 80-K, Beckman Coulter, USA). Po ukončení centrifugace byly zkumavky přeříznuty. Horní frakce (06T) a spodní frakce (06B) byly

kvantitativně sebrány a v obou frakcích byly stanoveny cholesterol a TG. Koncentrace VLDL-TG a VLDL-C byla vypočtena podle následujícího vzorce:

$$\text{VLDL-C} = \text{06T-C} \times \frac{\text{objem 06T}}{\text{objem plazmy}}$$

$$\text{VLDL-TG} = \text{06T-TG} \times \frac{\text{objem 06T}}{\text{objem plazmy}}$$

### 3.2.4 Stanovení inzulínu

Pro stanovení inzulínu byl použit kit Insulin(e) IRMA Kit od firmy Beckman Coulter (Praha).

Vzorky plazmy, kontrolní vzorky a kalibrátory byly inkubovány ve zkumavkách potažených první monoklonální protilátkou proti inzulínu spolu s druhou monoklonální protilátkou proti inzulínu značenou  $^{125}\text{I}$ . Po inkubaci a promytí zkumavek byla měřena aktivita  $^{125}\text{I}$  na gamacounteru (Gamacounter LB1204, Berthold, USA). Koncentrace inzulínu ve vzorcích vzrůstá s naměřenou radioaktivitou a určuje se interpolací z kalibrační křivky.

U vyšetřených dobrovolníků byla vypočtena hodnota homeostatického indexu inzulínové rezistence (HOMA-IR) podle rovnice (Haffner *et al.*, 1997).

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{lačná glukóza [mmol/l]} \times \text{lačný inzulín [mIU/l]}}{22,5}$$

### 3.2.5 Stanovení koncentrace LPL a apolipoproteinů

Pro stanovení koncentrace LPL byl použit ELISA kit od společnosti ALPCO Diagnostics (Salem, NH). Pro stanovení koncentrace ApoB byl použit kit Apolipoprotein B Human ELISA kit od společnosti Abcam plc, (Velká Británie). Pro stanovení koncentrace apoB-48 byl použit kit Human Apo B-48 ELISA Kit od společnosti Shibayagi Co., Ltd. (Japonsko). Tyto kity využívají metodu nazývanou sendvičová ELISA. Hodnocení spektrofotometrického stanovení bylo provedeno pomocí programu Software Gen 5 na přístroji Synergy 2 (BioTek Instruments, Inc., USA).

### 3.2.6 Stanovení koncentrace GLP-1

Pro stanovení celkového a aktivního GLP-1 byly použity kity GLP-1 Total ELISA a GLP-1 Active ELISA od společnosti EMD Millipore Corporation (USA).

Do vzorku krve určeného pro stanovení aktivního GLP-1 byl ihned po odběru přidán inhibitor DPP-IV (EMD Millipore, USA) dle instrukcí výrobce. Tyto kity využívají metodu nazývanou sendvičová ELISA. Hodnocení spektrofotometrického stanovení bylo provedeno pomocí programu Software Gen 5 na přístroji Synergy 2 (BioTek Instruments, Inc., USA).

### **3.2.7 Statistické zpracování výsledků**

Časový průběh jednotlivých parametrů v obou experimentech byl hodnocen analýzou rozptylu pro opakovaná měření v programu GraphPad InStat 3. V případě, že byly pomocí této metody zjištěny statisticky významné rozdíly, byly identifikovány pomocí následného (post hoc) t-testu s Bonferroniho korekcí. Rozdíly mezi průběhem změn jednotlivých parametrů po podání T+G snídaně a T snídaně byly stanoveny dvoufaktorovou analýzou rozptylu (ANOVA) pro opakovaná měření (JMP® 10.0.0, SAS Institute Inc.). Plochy pod křivkou (AUC) a plochy pod přírůstkovou křivkou (AUIC) byly porovnány pomocí párového t-testu nebo jeho neparametrického analogu v programu GraphPad InStat 3. Pro parametry vykazující významné změny jen v průběhu prvních 120 minut jsme hodnotili dvou- a osmihodinové AUC a AUIC a pro zbývající parametry jsme porovnávali osmihodinové AUC a AUIC. Výsledky jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka (SD).

### 3.3 Výsledky

Základní charakteristika dobrovolníků je uvedena v Tab. 2. Do studie byli zařazeni dobrovolníci, jejichž hladina TG v krvi byla v průměru  $1,1 \pm 0,5$  mmol/l, jednalo se tedy o normotriglyceridemické subjekty. Průměrný HOMA-IR byl  $1,7 \pm 0,8$  a u žádného z dobrovolníků nepřekročil hodnotu 2,68, která je považována za hranici inzulinové rezistence (Haffner *et al.*, 1997). Ve skupině dobrovolníků byli pouze 4 kuřáci.

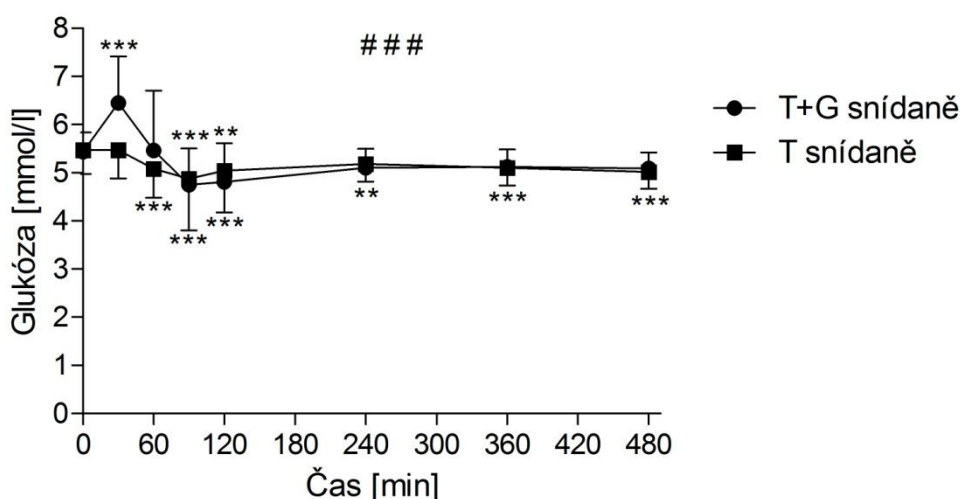
**Tab. 2: Základní charakteristika dobrovolníků.**

Charakteristika	Průměr $\pm$ SD
Věk [roky]	$34,0 \pm 8,2$
BMI [ $\text{kg/m}^2$ ]	$26,1 \pm 3,2$
Obvod pasu [cm]	$92,1 \pm 9,8$
Obvod boků [cm]	$101,4 \pm 6,8$
Glukóza [mmol/l]	$5,5 \pm 0,5$
Celkový cholesterol [mmol/l]	$4,4 \pm 0,8$
TG [mmol/l]	$1,1 \pm 0,5$
HOMA-IR	$1,7 \pm 0,8$

Data jsou prezentována jako průměr  $\pm$  SD (n = 30).

### 3.3.1 Vliv podání tuku a glukózy na sekreci GLP-1

Po konzumaci T+G snídaně došlo k významnému zvýšení koncentrace glukózy v plazmě. Třicet minut po podání 25 g glukózy glykémie vzrostla z 5,4 na 6,5 mmol/l. Jednu hodinu po podání glukózy se hladina normalizovala a poté došlo k mírnému poklesu hladiny glukózy v plazmě, který ale nedosáhl statistické významnosti. Po konzumaci T snídaně se koncentrace glukózy v plazmě po 30 minutách nezměnila a poté došlo k mírnému poklesu glykémie, který byl statisticky významný (Obr. 11). Pomocí dvoufaktorové ANOVA bylo ukázáno, že průběh glykémie se lišil mezi oběma experimenty ( $p < 0,001$ ), významné rozdíly však mezi oběma křivkami byly demonstrovány pouze v prvních 120 minutách, nikoli v pozdějších fázích pokusu. To bylo dokumentováno i porovnáním dvouhodinových AUC a AUIC (Tab. 3), zatímco mezi osmihodinovými AUC a AUIC nebyly zjištěny žádné rozdíly (výsledky nejsou prezentovány).

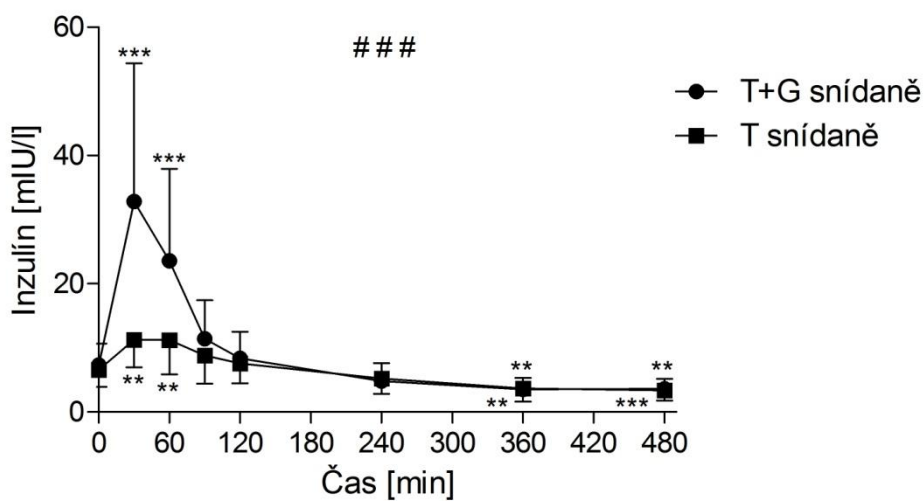


**Obr. 11: Koncentrace glukózy**

\*\*\*  $p < 0,001$  oproti času 0, \*\*  $p < 0,01$  oproti času 0, ###  $p < 0,001$  (dvoufaktorová ANOVA pro opakovaná měření pro porovnání mezi oběma experimenty ( $n = 30$ )).

Po konzumaci T+G snídaně došlo podle očekávání k významnému zvýšení koncentrace inzulinu v plazmě. Třicet minut po podání glukózy byla koncentrace inzulinu v plazmě 4,5x vyšší oproti lačnému stavu (7,3 vs. 32,8 mIU/l). Následně inzulinémie klesala a 90 minut po podání snídaně již byla normalizována. Po konzumaci T snídaně došlo rovněž ke zvýšení inzulinémie (6,6 vs. 11,3 mIU/l). Nárůst byl však výrazně nižší v porovnání s podáním T+G snídaně (Obr. 12). Byl prokázán statisticky vysoce významný rozdíl ( $p < 0,001$ ) v průběhu inzulinémie mezi oběma experimenty.

V souladu s tím je i nález, že AUC a AUIC inzulínu jsou po T+G snídani dvojnásobně a čtyřnásobně zvýšeny v porovnání s T snídání (Tab. 3).

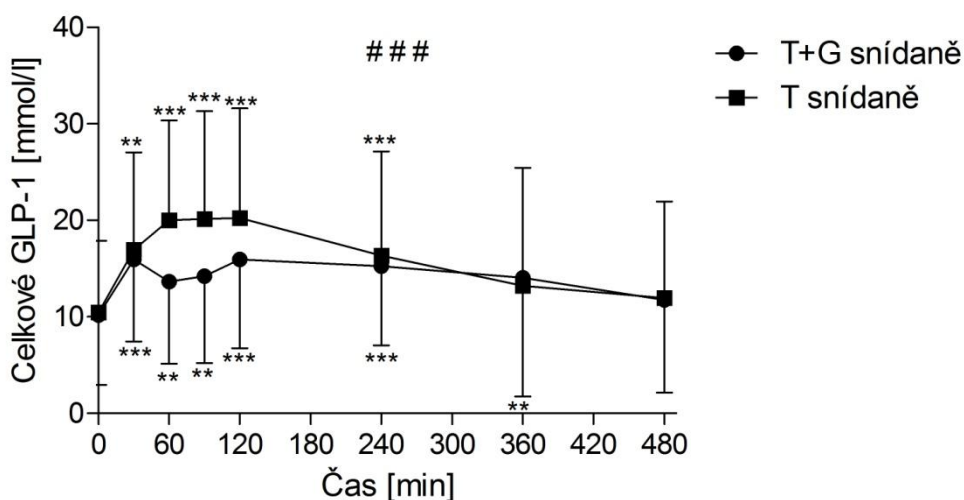


**Obr. 12: Koncentrace inzulínu.**

\*\*\*  $p < 0,001$  oproti času 0, \*\*  $p < 0,01$  oproti času 0, ###  $p < 0,001$  (dvoufaktorová ANOVA pro opakovaná měření pro porovnání mezi oběma experimenty ( $n = 30$ )).

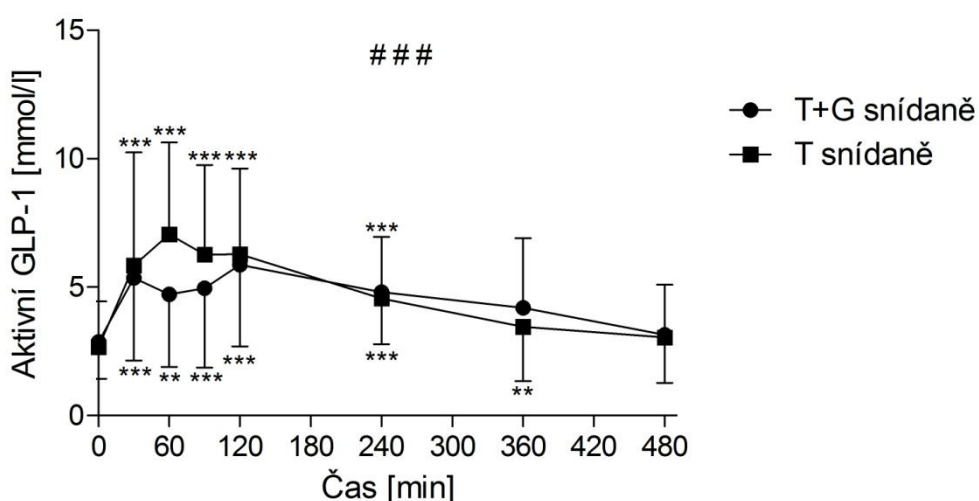


Koncentrace aktivního i celkového GLP-1 vzrostla po konzumaci experimentální snídaně, přičemž změny obou forem GLP-1 vykazovaly v podstatě identickou dynamiku (Obr. 13, Obr. 14). Pomocí dvoufaktorové ANOVA bylo prokázáno, že se průběh změn koncentrace aktivního i celkového GLP-1 mezi oběma experimenty významně lišil ( $p < 0,001$ ). Odpověď obou forem GLP-1 byla významně snížena, když bylo k tukové zátěži přidáno 25 g glukózy – dvouhodinová AUC aktivního GLP-1 byla o 22 % nižší a dvouhodinová AUC celkového GLP-1 byla o 18 % nižší (Tab. 3).



**Obr. 13: Koncentrace celkového GLP-1.**

\*\*\*  $p < 0,001$  oproti času 0, \*\*  $p < 0,01$  oproti času 0, ###  $p < 0,001$  (dvoufaktorová ANOVA pro opakovaná měření pro porovnání mezi oběma experimenty ( $n = 30$ )).



**Obr. 14: Koncentrace aktivního GLP-1.**

\*\*\*  $p < 0,001$  oproti času 0, \*\*  $p < 0,01$  oproti času 0, ###  $p < 0,001$  (dvoufaktorová ANOVA pro opakovaná měření pro porovnání mezi oběma experimenty ( $n = 30$ )).

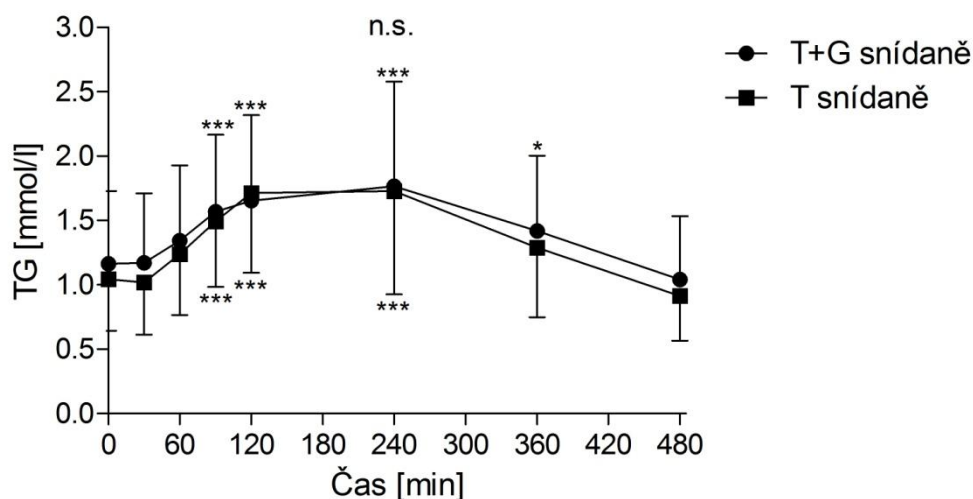
**Tab. 3: Dvouhodinová plocha pod křivkou (AUC) a přírůstková plocha pod křivkou (AUC) pro vybrané parametry během postprandiální lipémie.**

Parametr	2h AUC (0-2 h)			2h AUC (0-2 h)		
	T+G	T	t-test	T+G	T	t-test
Glukóza [mmol*h/l]	10,9 ± 1,5	10,4 ± 1,0	0,001	0,0 ± 1,2	-0,6 ± 0,6	0,003
Inzulín [mIU*h/l]	37,9 ± 17,3	19,2 ± 6,7	< 0,001	23,2 ± 14,2	6,0 ± 4,5	< 0,001
Celkové GLP-1 [pmol*h/l]	28,4 ± 16,4	36,2 ± 19,1	< 0,001	8,1 ± 6,0	15,3 ± 8,4	< 0,001
Aktivní GLP-1 [pmol*h/l]	9,7 ± 5,2	11,8 ± 5,7	< 0,001	4,0 ± 4,0	6,5 ± 4,6	< 0,001

Data jsou prezentována jako průměr ± SD (n = 30).

### 3.3.2 Vliv podání tuku a glukózy na transport TG

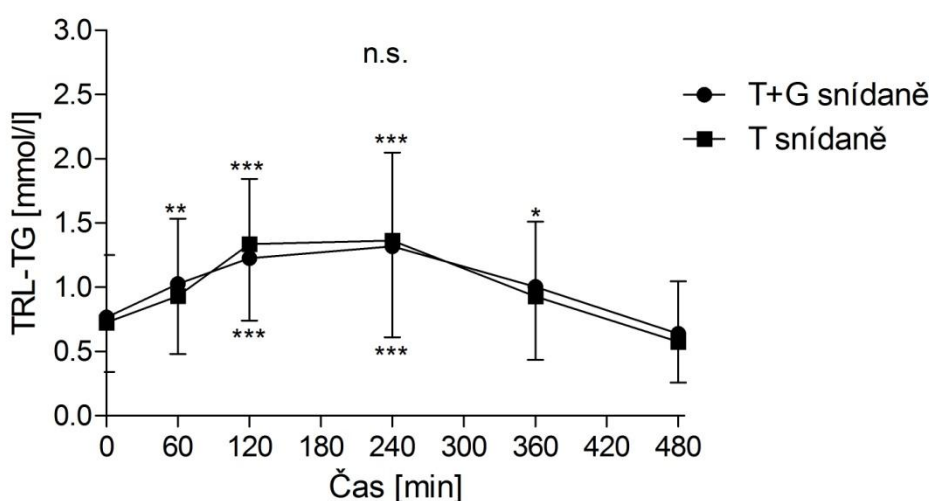
Konzumace 75 g tuku indukovala významný nárůst triglyceridémie v plazmě, přičemž nejvyšší koncentrace TG byla naměřena mezi 2. a 4. hodinou po konzumaci experimentální snídani. Čtyři hodiny po podání T+G snídani byla koncentrace TG zvýšena o 52 % (1,16 vs. 1,77 mmol/l), po podání T snídani byl nárůst TG v plazmě o 66 % (1,04 vs. 1,73 mmol/l) (Obr. 15). Mezi jednotlivými experimenty nebyl prokázán statisticky významný rozdíl a v souladu s tím se neliší ani plochy pod křivkou TG mezi oběma experimenty (Tab. 4). Přidání glukózy tedy neovlivnilo průběh postprandiální triglyceridémie.



**Obr. 15: Koncentrace triacylglycerolů (TG).**

\*\*\*  $p < 0,001$  oproti času 0, \*  $p < 0,05$  oproti času 0, n.s. ( $p = 0,306$ , dvoufaktorová ANOVA pro opakovaná měření pro porovnání mezi oběma experimenty ( $n = 30$ )).

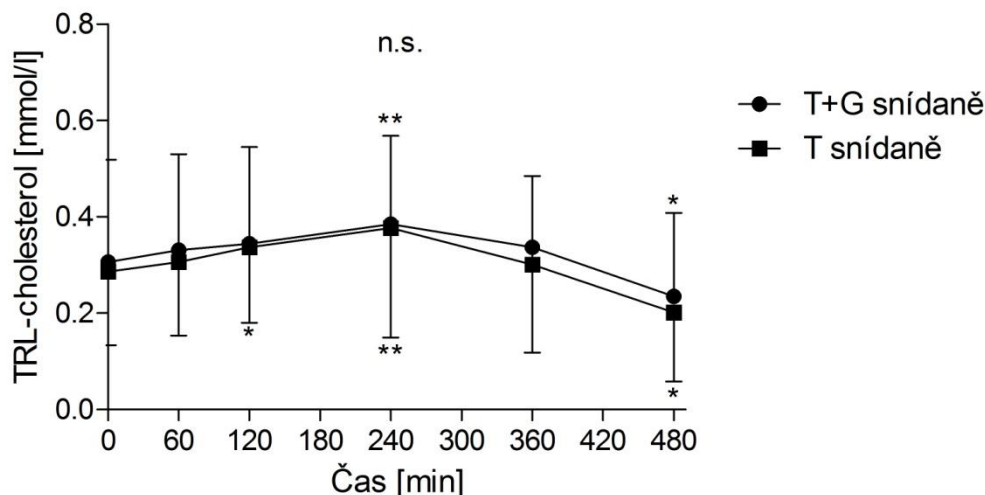
Obdobné výsledky můžeme vidět i v koncentraci TG ve frakci částic TRL, která byla izolována pomocí ultracentrifugace. Nejvyšší koncentrace TG byla 4 hodiny po konzumaci experimentální snídaně. Čtyři hodiny po podání T+G snídaně byla koncentrace TRL-TG zvýšena o 71 % (0,77 vs. 1,32 mmol/l), po podání T snídaně byl nárůst TRL-TG o 92 % (0,73 vs. 1,4 mmol/l) (Obr. 16). Mezi jednotlivými experimenty nebyl prokázán statisticky významný rozdíl, přidání glukózy tedy nemělo vliv na průběh kumulace TG v TRL-TG v postprandiální fázi. Porovnání ploch pod křivkou rovněž neukázalo statisticky významný rozdíl v průběhu změn koncentrace TRL-TG (Tab. 4).



**Obr. 16: Koncentrace TRL-TG.**

\*\*\*  $p < 0,001$  oproti času 0, \*  $p < 0,05$  oproti času 0, n.s. ( $p = 0,150$ , dvoufaktorová ANOVA pro opakovaná měření pro porovnání mezi oběma experimenty ( $n = 30$ )).

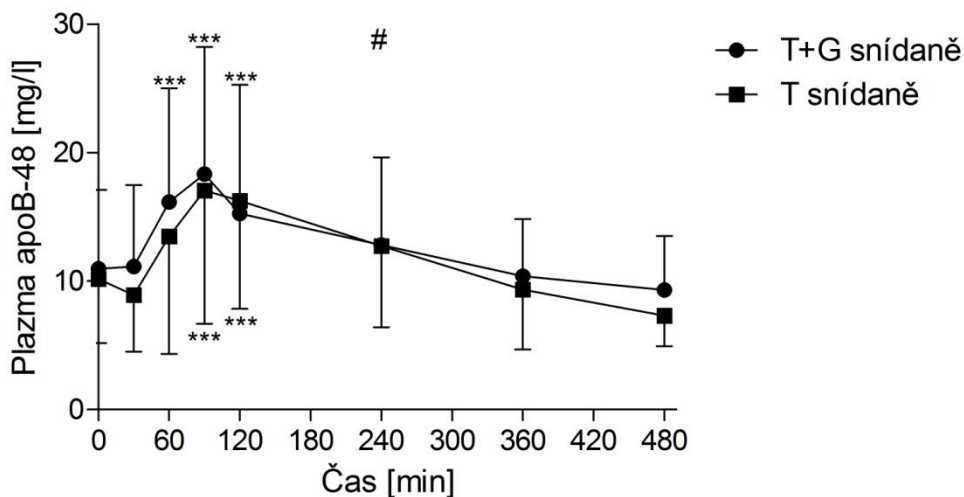
V TRL frakci byla rovněž stanovena koncentrace cholesterolu (TRL-C). Koncentrace TRL-C rostla a svého maxima dosáhla 4 hodiny po podání snídaně, kdy došlo k nárůstu o 26 % (0,31 vs. 0,39 mmol/l) po konzumaci T+G snídaně a o 31 % (0,29 vs. 0,38 mmol/l) po podání T snídaně (Obr. 17). Mezi jednotlivými experimenty nebyl prokázán statisticky významný rozdíl. Porovnání ploch pod křivkou rovněž neukázalo staticky významný rozdíl v průběhu změn koncentrace TRL-TG (Tab. 4).



**Obr. 17: Koncentrace cholesterolu v TRL.**

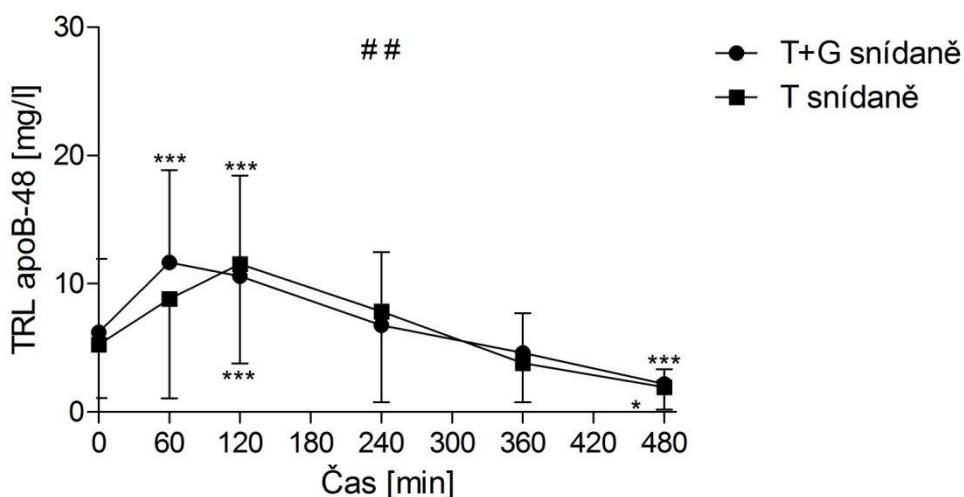
\*\*  $p < 0,01$  oproti času 0, \*  $p < 0,05$  oproti času 0, n.s. ( $p = 0,538$ , dvoufaktorová ANOVA pro opakovaná měření pro porovnání mezi oběma experimenty) ( $n = 30$ ).

Koncentrace apoB-48 byla měřena v plazmě a ve frakci TRL částic. Koncentrace apoB-48 v plazmě po T+G snídani statisticky významně vzrostla již po 60 minutách, zatímco po T snídani až po 90 minutách, v obou experimentech dosáhla maxima 90 minut po podání snídane (Obr. 18). Koncentrace apolipoproteinu se 4 hodiny po podání experimentální snídane již nelišila od bazálních hodnot. Ve frakci TRL částic dosáhla koncentrace apoB-48 maxima jednu hodinu po podání T+G snídane, zatímco po podání T snídane až po dvou hodinách (Obr. 19). Pomocí dvoufaktorové ANOVA pro opakovaná měření bylo zjištěno, že průběh změn koncentrace apoB-48 v plazmě i TRL se lišil mezi oběma experimenty (Obr. 18, Obr. 19), avšak porovnání ploch pod křivkou apo B-48 v plazmě i v TRL neukázalo statisticky významný rozdíl (Tab. 4).



**Obr. 18: Koncentrace apoB-48 v plazmě.**

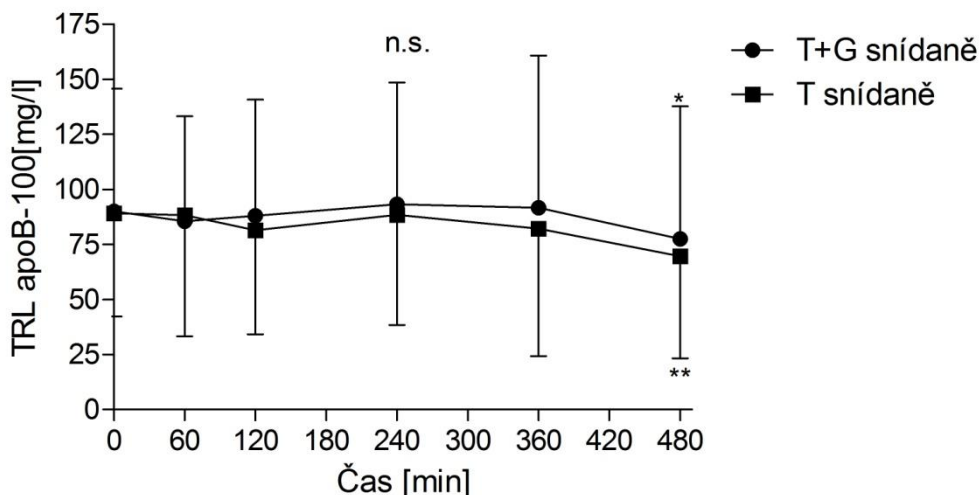
\*\*\*  $p < 0,001$  oproti času 0, #  $p < 0,05$  (dvoufaktorová ANOVA pro opakovaná měření pro porovnání mezi oběma experimenty ( $n = 30$ )).



**Obr. 19: Koncentrace apoB-48 ve frakci TRL.**

\*\*\*  $p < 0,001$  oproti času 0, \*  $p < 0,05$  oproti času 0, ##  $p < 0,01$  (dvoufaktorová ANOVA pro opakovaná měření pro porovnání mezi oběma experimenty ( $n = 30$ )).

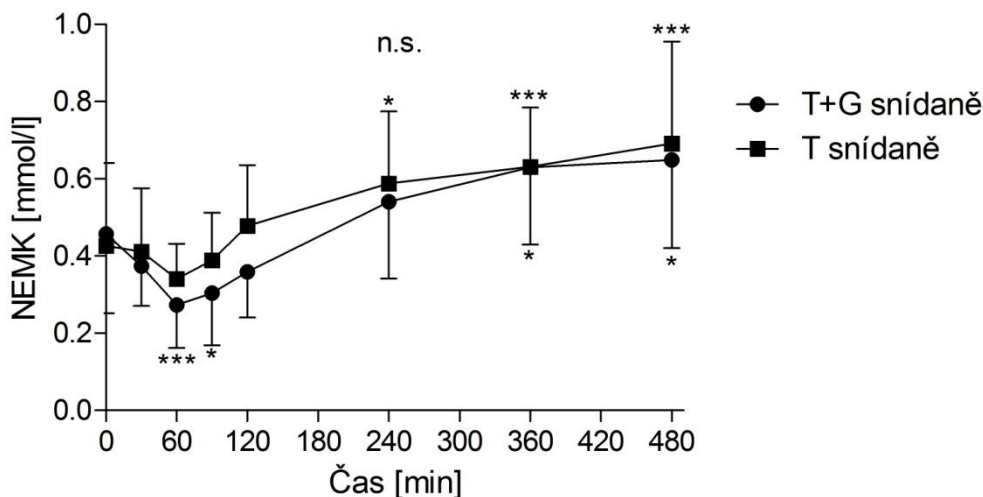
Koncentrace apoB-100 byla měřena pouze ve frakci TRL částic, neboť cca 90 % apoB-100 je v plazmě neseno částicemi LDL. V průběhu obou pokusů se koncentrace apoB-100 v TRL významně neměnila až na mírný pokles po 8 hodinách (Obr. 20). Mezi plochami pod křivkou apo B-100 nebyly mezi oběma pokusy rovněž zjištěny rozdíly (Tab. 4).



Obr. 20: Koncentrace apoB-100 v TRL částicích.

\*\*  $p < 0,01$  oproti času 0, \*  $p < 0,05$  oproti času 0, n.s. ( $p = 0,421$ , dvoufaktorová ANOVA pro opakovaná měření pro porovnání mezi oběma experimenty ( $n = 30$ )).

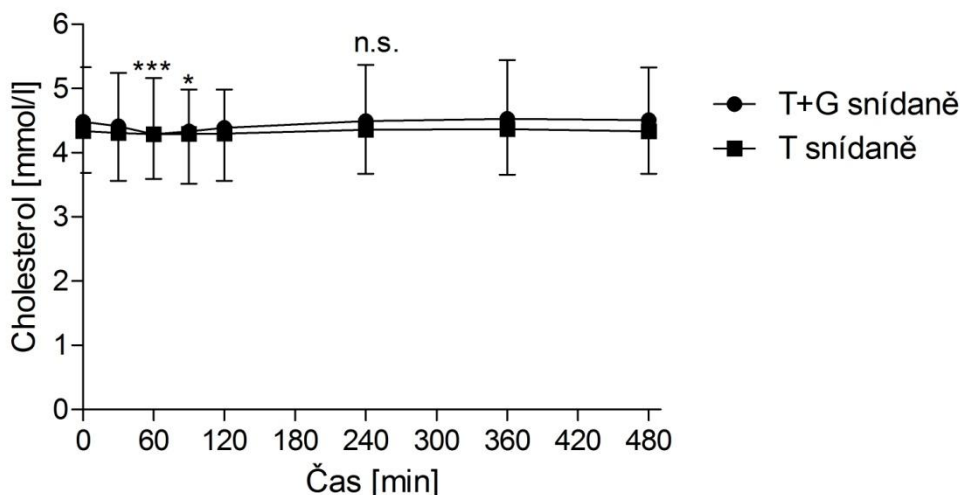
V obou pokusech došlo po konzumaci experimentální snídaně k poklesu koncentrace NEMK s minimem po 60 minutách, ale změna dosáhla statistické významnosti pouze po podání T+G snídaně (z 0,46 na 0,27 mmol/l), nikoli po podání samotného tuku (z 0,42 na 0,34 mmol/l) (Obr. 21). Poté došlo v experimentech k výraznému nárůstu koncentrace NEMK. V průběhu změn koncentrace NEMK ani v AUC NEMK nebyly mezi oběma experimenty prokázány rozdíly, AUIC NEMK byla po podání T+G snídaně o 60% nižší než po T snídani (Tab. 4).



Obr. 21: Koncentrace NEMK.

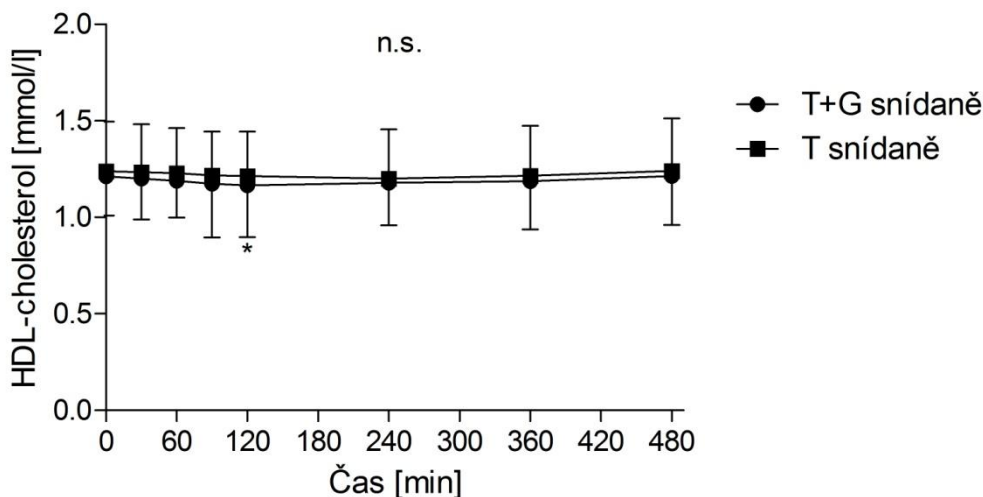
\*\*\*  $p < 0,001$  oproti času 0, \*  $p < 0,05$  oproti času 0, n.s. ( $p = 0,097$ , dvoufaktorová ANOVA pro opakovaná měření pro porovnání mezi oběma experimenty ( $n = 30$ )).

V koncentraci celkového cholesterolu, HDL-cholesterolu a LDL-cholesterolu byl v průběhu pokusů několikrát zaznamenán statisticky významný pokles na úrovni cca 5 % (Obr. 22, Obr. 23, Obr. 24). Tento náález byl ale konzistentní pouze v případě LDL-cholesterolu, kde byl v obou experimentech zaznamenán statisticky významný pokles mezi 60. až 120. minutou (Obr. 24). Průběh křivek cholesterolu, HDL-cholesterolu i LDL-cholesterolu a odpovídající AUC a AUIC se mezi oběma experimenty nelišily (Tab. 4).



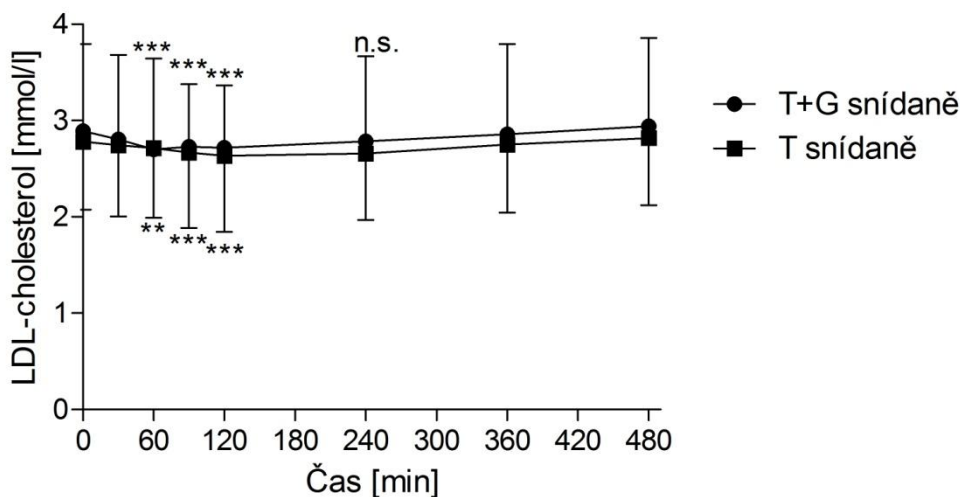
**Obr. 22: Koncentrace cholesterolu.**

\*\*\*  $p < 0,001$  oproti času 0, \*  $p < 0,05$  oproti času 0, n.s. ( $p = 0,057$ , dvoufaktorová ANOVA pro opakovaná měření pro porovnání mezi oběma experimenty ( $n = 30$ )).



**Obr. 23: Koncentrace HDL-cholesterolu.**

\*  $p < 0,05$  oproti času 0, n.s. ( $p = 0,783$ , dvoufaktorová ANOVA pro opakovaná měření pro porovnání mezi oběma experimenty ( $n = 30$ )).



Obr. 24: Koncentrace LDL cholesterolu.

\*\*\*  $p < 0,001$  oproti času 0, n.s. ( $p = 0,066$ , dvoufaktorová ANOVA pro opakovaná měření pro porovnání mezi oběma experimenty ( $n = 30$ )).

Tab. 4: Plocha pod křivkou (AUC) a přírůstková plocha pod křivkou (AUC) pro vybrané parametry během postprandiální lipémie.

Parametr	AUC (0-8 h)			AUC (0-8 h)		
	T+G	T	t-test	T+G	T	t-test
TG [mmol*h/l]	11,8 ± 4,7	11,2 ± 4,1	n.s.	2,5 ± 1,9	2,9 ± 2,6	n.s.
TRL - TG [mmol*h/l]	8,5 ± 4,2	8,6 ± 3,8	n.s.	2,4 ± 1,7	2,7 ± 2,2	n.s.
TRL-C [mmol*h/l]	2,68 ± 1,6	2,51 ± 1,3	n.s.	0,2 ± 0,7	0,2 ± 0,7	n.s.
NEMK [mmol*h/l]	4,0 ± 1,0	4,4 ± 1,2	n.s.	0,4 ± 1,4	1,0 ± 1,2	0,02
ApoB-48 [mg*h/l]	100,4 ± 43,4	94,1 ± 42,9	n.s.	12,7 ± 27,1	12,7 ± 24,0	n.s.
TRL-ApoB-48 [mg*h/l]	55,6 ± 38,2	54,0 ± 36,0	n.s.	6,0 ± 21,7	11,9 ± 27,2	n.s.
TRL-ApoB -100 [mg*h/l]	710,1 ± 432,8	662,3 ± 374,5	n.s.	-10,0 ± 196	-48,2 ± 174	n.s.
Cholesterol [mmol*h/l]	35,7 ± 6,8	34,7 ± 5,4	n.s.	-0,2 ± 1,1	-0,03 ± 1,4	n.s.
HDL- Chol. [mmol*h/l]	9,5 ± 2,2	9,7 ± 2,0	n.s.	-0,2 ± 0,5	-0,2 ± 0,5	n.s.
LDL-Chol. [mmol*h/l]	22,5 ± 7,2	21,7 ± 5,6	n.s.	-0,7 ± 0,9	-0,6 ± 0,7	n.s.

Data jsou prezentována jako průměr ± SD ( $n = 30$ ).



Koncentrace LPL byla stanovena v post-heparinové plazmě odebrané 8 hodin po podání experimentální snídani. Koncentrace LPL se nelišila mezi oběma experimenty (Tab. 5).

**Tab. 5: Koncentrace LPL v poheparinové plazmě.**

LPL	T+G snídani	T snídani	t-test
[ng/ml]	502,9 ± 101,9	475,6 ± 95,3	n.s.

Data jsou prezentována jako průměr ± SD (n = 30).

### 3.4 Diskuze

Přidání 25 g glukózy k tukové zátěži indukovalo očekávanou fyziologickou odpověď glykémie a inzulinémie. Koncentrace celkového a aktivního GLP-1 byla po podání glukózy a tuku nižší než po podání samotného tuku. Přídavek glukózy neovlivnil rozsah a průběh postprandiální triglyceridémie a koncentraci cholesterolu a TG v TRL částicích. Přidání glukózy stimulovalo rychlejší odpověď chylomikronů, což bylo dokumentováno na základě změn v koncentraci apoB-48.

#### 3.4.1 Vliv podání tuku a glukózy na sekreci GLP-1

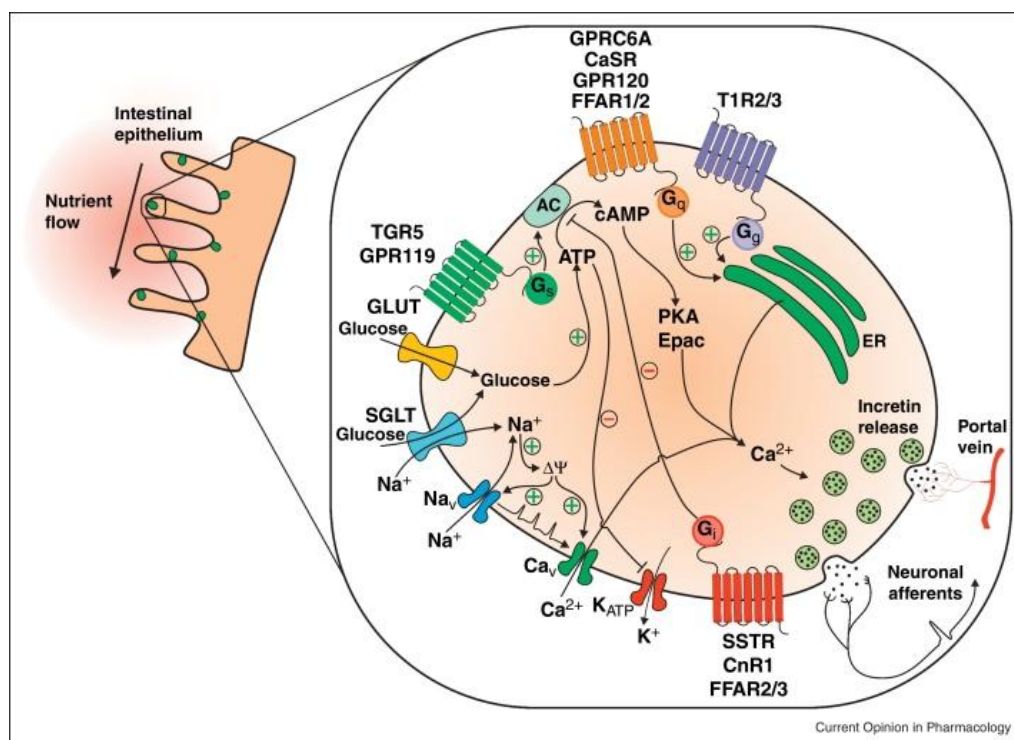
Naše studie elegantně ukázala, že GLP-1 je inzulinotropní peptid, který stimuluje sekreci inzulinu v závislosti na přítomnosti glukózy. Pokud byl podán samotný tuk, který významně neovlivnil glykémii, nepozorovali jsme významnou odpověď inzulinémie, ačkoli došlo k výraznému vzestupu koncentrace jak aktivního tak celkového GLP-1.

Aktivní GLP-1 představuje metabolicky aktivní inkretin, zatímco celkové GLP-1 zahrnuje také molekuly, které byly inaktivovány pomocí proteolytické aktivity DPP-4. Kvůli velmi krátkému poločasu aktivního GLP-1 je celkové GLP-1 považováno za lepší marker sekrece GLP-1 (Holst, 2007). Vzhledem k podobné odpovědi aktivního a celkového GLP-1 (Obr. 13, Obr. 14) můžeme předpokládat, že přidání glukózy k tukové zátěži přímo ovlivnilo produkci GLP-1.

Pokud bylo k tukové zátěži přidáno 25 g glukózy, byla odpověď jak celkového tak aktivního GLP-1 překvapivě výrazně nižší než po podání tuku samotného.

Glukóza a tuk indukují odpověď GLP-1 (Carr *et al.*, 2008; Herrmann *et al.*, 1995) a každý nutrient využívá svou vlastní nezávislou regulační dráhu, pomocí které stimuluje sekreci GLP-1 v intestinálních L-buňkách. V horní části tenkého střeva je uvolňování GLP-1 spuštěno pomocí kotransportéru SGLT1 (= *sodium-glucose linked*

*transporter*). Kotransport glukózy s  $\text{Na}^+$  způsobí depolarizaci membrány a otevření napětově řízených vápenatých kanálů na membráně a vstup  $\text{Ca}^{2+}$  do cytoplazmy. Vápenaté ionty umožní splnutí váčků s plazmatickou membránou a tím dojde k exocytóze GLP-1 do cirkulace. Lipidy signalizují uvolnění inkretinů pomocí receptorů spřažených s G-proteinem na L-buňkách (např. GPR120, GPR119, GPR40). Dlouhé a středně dlouhé řetězce mastných kyselin se váží na receptor spřažený s  $G_q$  proteinem a tím dochází k aktivaci fosfolipázy C. Aktivní fosfolipáza C prostřednictvím fosfatidylinositolu-1,4,5-trifosfátu ( $\text{IP}_3$ ) spustí uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  z endoplazmatického retikula, které indukují splnutí váčku nesoucí inkretiny s membránou a tím dojde k uvolnění inkretinů do cirkulace (Obr. 25) (Ezcurra *et al.*, 2013). Kombinace tuku a glukózy by tedy neměla snížit sekreci GLP-1 a můžeme pouze spekulovat, proč přidání glukózy k tukové zátěži potlačuje odpověď GLP-1.



**Obr. 25: Model sekrece inkretinů z enteroendokrinních buněk.**

Model molekulárních mechanismů, které jsou zapojeny do sekrece inkretinů z enteroendokrinních buněk. Každý nutrient aktivuje svou vlastní signální dráhu, která vede ke zvýšení intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ . Vápenaté ionty indukují splnutí váčků s plazmatickou membránou a tím exocytózu glukagonu podobného peptidu 1 (GLP-1) do cirkulace.

Převzato z (Ezcurra *et al.*, 2013).

Jedním z možných vysvětlení je, že glukóza podaná spolu s experimentálním jídlem může zpomalit vyprazdňování žaludku (Cohen & Berger, 1990) a tím zpomalit sekreci GLP-1 v intestinálních buňkách. To je však nepravděpodobné, protože

zpomalené vyprazdňování žaludku by oddálilo počátek postprandiálních změn v triglyceridémii, a to nebylo pozorováno. Průběh postprandiální triglyceridémie nebyl rozdílný po podání rozdílných experimentálních snídaní. Rovněž je třeba zdůraznit, že vliv glukózy na zpomalené vyprazdňování žaludku byl dokumentován při vyšších dávkách glukózy (50 a 100 gramů).

Druhým možným vysvětlením je, že po konzumaci T+G snídaně mohlo dojít k rychlejšímu vzestupu koncentrace GLP-1 s vrcholem dříve než 30 minut po podání snídaně. Tento peak by v designu našeho experimentu nebyl detekován. To je také velmi nepravděpodobné, neboť takový peak nebyl pozorován ve studiích, které používaly rozdílné nutrienty k indukci inkretinové odpovědi (Carr *et al.*, 2008; Herrmann *et al.*, 1995).

Do třetice můžeme spekulovat, zda požití glukózy může aktivovat zpětnovazebnou inhibici sekrece GLP-1 prostřednictvím hyperglykémie nebo hyperinzulinémie. Například Vollmer a kol. ukázali, že akutní hyperglykémie během hyperglykemického clampu způsobila redukci postprandiální hladiny GLP-1 přibližně o 50 %. Nelze vyloučit, že v těchto experimentech ke zpětnovazebné inhibici sekrece GLP-1 přispěla i hyperinzulinémie, neboť indukce hyperglykémie byla spojena i s výrazně zvýšenou inzulinémií způsobenou stimulací sekrece endogenního inzulinu (Vollmer *et al.*, 2009). Vzhledem k tomu, že vzestup glykémie po podání glukózy v našem experimentu nedosahoval hodnot glykémie při hyperglykemickém clampu, mohl by vzestup inzulinémie být faktorem, který zpětnovazebně reguluje sekreci GLP-1.

### 3.4.2 Vliv podání tuku a glukózy na TG

Hypertriglyceridémie v postprandiální fázi je způsobena akumulací TRL částic. Přidání 25 g glukózy k tukové zátěži nemělo vliv na průběh a rozsah postprandiální triglyceridémie ani na koncentraci TRL-TG a TRL-C. To je v protikladu s předchozími studiemi, které ukázaly, že přidání glukózy k tukové zátěži redukuje rozsah postprandiální lipémie a míra redukce je závislá na množství podané glukózy (Cohen *et al.*, 1990). V uvedené studii vedlo podání glukózy ke zpožděnému vyprazdňování žaludku a ke snížení produkce VLDL. Rozdílný nálezn může být vysvětlen nižší dávkou glukózy (50 g a 100 g vs. 25 g glukózy) a vyšší dávkou tuku (40 g vs. 75 g tuku) v naší studii. Jak je uvedeno výše, je nepravděpodobné, že by v naší studii zpomalované vyprazdňování žaludku hrálo významnou roli.

Po podání samotného tuku byl pozorován mírný nárůst koncentrace inzulinu (Obr. 12). To lze vysvětlit tím, že podané množství šlehačky obsahuje 7 g laktózy, tedy 3,5 g glukózy, která by mohla indukovat inzulin. Je otázkou, zda tak malé množství indukuje detekovatelné změny v inzulinémii. Nejpravděpodobněji za tímto mírným nárůstem inzulinémie stojí mléčné proteiny, které jsou inzulinotropní (Newsholme *et al.*, 2014; Nilsson *et al.*, 2004; Ostman *et al.*, 2001). Zdá se, že námi pozorovaný vzestup inzulinémie ale není dostatečně vysoký pro to, aby ovlivnil lipolýzu v tukové tkáni, neboť na rozdíl od pokusu, ve kterém byla podána T+G snídaně, nedošlo k signifikantnímu poklesu NEMK.

NEMK jsou hlavním substrátem pro syntézu TG, které jsou z jater secernovány v částicích VLDL (Lewis, 1997). K vzestupu triglyceridémie v postprandiální fázi přispívají vedle chylomikronů i částice VLDL. Protože jsme nenalezli statisticky významný rozdíl v AUC NEMK mezi T+G a T snídaní (Tab. 4), lze se domnívat, že příspěvek VLDL-TG k postprandiální triglyceridémii se mezi oběma experimenty neliší. Nicméně po podání T+G snídaně byla v časně fázi postprandiální lipémie pozorována mírná ale statisticky významná suprese koncentrace NEMK (Obr. 21), kterou lze vysvětlit supresí lipolýzy v tukové tkáni indukovanou inzulinem.

Dalším významným činitelem ovlivňujícím rozsah postprandiální lipémie je množství a aktivita LPL, která je „rate-limiting“ faktorem clearance TRL-TG v cirkulaci. Přidání glukózy k tukové zátěži nemělo vliv na koncentraci LPL v plazmě odebrané 10 minut po intravenózní (*i.v.*) aplikaci heparinu, který uvolní enzym z endoteliální stěny kapilár mimojaterních tkání do cirkulace (Tab. 5). Koncentrace LPL stanovená ELISA metodou koreluje s aktivitou LPL a lze se tedy domnívat, že přídavek 25 g glukózy neovlivnil množství ani aktivitu LPL v cirkulaci.

Naše pozorování, že se průběh triglyceridémie neliší mezi oběma experimenty lze vysvětlit tím, že přídavek malého množství glukózy neovlivnil ani příspěvek chylomikronů, ani produkci VLDL a ani aktivitu LPL, která odpovídá za clearance TRL-TG.

Navzdory tomu, že nebyly prokázány rozdíly v průběhu postprandiální triglyceridémie, dvoufaktorová ANOVA pro opakovaná měření odhalila rozdíly v koncentraci apoB-48 v plazmě a v TRL částicích mezi experimenty. Je třeba zdůraznit, že koncentrace apoB-48 je přímo úměrná koncentraci chylomikronů a jejich remnantů, neboť každá částice nese pouze 1 molekulu apoB-48. K statisticky významnému vzestupu koncentrace apoB-48 v plazmě i TRL dochází již 60 minut

po konzumaci T+G snídaně, zatímco po podání T snídaně je nástup apoB-48 opožděn (Obr. 18, 20). Dřívější peak v koncentraci apoB-48 po podání T+G snídaně lze vysvětlit tím, že po každém jídle zůstává část TG v enterocytech a je secernována velmi rychle po podání následujícího jídla. To bylo demonstrováno analýzou složení MK v těchto chylomikronech (Fielding *et al.*, 1996). Jako stimulus této časně postprandiální sekrece chylomikronů může sloužit i samotná glukóza (Robertson *et al.*, 2003). To by mohlo vysvětlit naše pozorování, že po podání glukózy s tukovou zátěží dochází k urychlení vstupu chylomikronů do cirkulace. Zároveň glukóza může přímo zvyšovat produkci chylomikronů nezávisle na změnách v koncentraci hormonů slinivky břišní nebo vyprazdňování žaludku (Xiao *et al.*, 2013). Bylo také ukázáno, že jídlo („mixed meal“) s vysokým glykemickým indexem vede k vyšší koncentraci apoB-48 v porovnání s jídlem s nízkým glykemickým indexem (Harbis *et al.*, 2001).

Koncentrace apoB-100 v TRL se v průběhu obou pokusů významně neměnila až na mírný pokles po 8 hodinách. Mezi plochami pod křivkou apo B-100 nebyly mezi oběma pokusy rovněž zjištěny rozdíly (Tab. 4). To je poněkud překvapivé, neboť bylo opakovaně ukázáno, že v postprandiální fázi koncentrace apoB-100 významně vzrůstá (Karpe *et al.*, 1993; Schneeman *et al.*, 1993). Tyto práce ovšem použily pro stanovení koncentrace apoB-100 v TRL denaturující gradientovou polyakrylamidovou elektroforézu. Námi použitá ELISA nemusí být pro stanovení apoB-100 vhodná – bylo ukázáno, že imunoreaktivita apoB-100 závisí na velikosti částic a liší se tedy mezi částicemi LDL i různě velkými subfrakcemi VLDL (Tikkanen *et al.*, 1984). Přitom protilátky jsou obvykle připravovány proti nejsnáze dostupným částicím LDL a nemusí tedy dobře reflektovat změny koncentrace výrazně větších částic VLDL.

V koncentraci celkového cholesterolu, HDL-cholesterolu a LDL-cholesterolu byl v průběhu pokusů několikrát zaznamenán statisticky významný pokles (Obr. 23-25). Tento nález byl ale konzistentní pouze v případě LDL-cholesterolu, kdy byl v obou experimentech zaznamenán pokles cca o 5 % mezi 60. až 120. minutou (Obr. 24). Lze předpokládat, že za tento pokles je odpovědná akcentovaná výměna cholesterylesterů z částic LDL za TG z částic TRL zprostředkovaná CETP v době, kdy chylomikrony bohaté na TG vstupují do cirkulace.

Závěrem lze říci, že přidání 25 g glukózy k tukové zátěži indukovalo očekávanou fyziologickou odpověď glykémie a inzulinémie a zároveň překvapivě potlačilo odpověď GLP-1 v porovnání se samotnou tukovou zátěží. Mechanismus této suprese je dosud nejasný. Přidání glukózy neovlivnilo rozsah a průběh postprandiální

triglyceridémie a koncentraci TRL-C a TRL-TG, ačkoliv stimulovalo rychlejší odpověď chylomikronů po podání snídaně, což bylo hodnoceno na základě změn v koncentraci apoB-48.

Pokud by měl být tento test použit pro studium mechanismů podílejících se na regulaci postprandiální lipémie, je přidání 25 g glukózy podstatně výhodnější, neboť indukuje fyziologickou odpověď inzulinémie a na rozdíl od vyšších dávek glukózy nemá vliv na průběh triglyceridémie v postprandiální fázi (Cohen *et al.*, 1990). Na druhé straně, pokud by tento test byl zaveden do širší klinické praxe a byl by hodnocen na základě nejsnáze dostupného stanovení koncentrace TG, není přidání glukózy k tukové zátěži nezbytné, neboť odpověď triglyceridémie není podáním glukózy ovlivněna.

## 4. Vliv genotypu APOA5 na průběh postprandiální lipémie

### 4.1 Úvod

Apolipoprotein A-V (apoA-V) má významný vliv na koncentraci TG v cirkulaci (Pennacchio *et al.*, 2001; van der Vliet *et al.*, 2001). Přesná úloha apoA-V v regulaci koncentrace TG není dosud zcela objasněna. Předpokládá se, že by apoA-V mohl zvyšovat „clearance“ TRL částic z cirkulace tím, že stimuluje aktivitu LPL a vazbu TRL částic k endotelu (Fruchart-Najib *et al.*, 2004; Merkel & Heeren, 2005a; Shu *et al.*, 2010). Alternativně se předpokládá, že apoA-V může redukovat sekreci VLDL (Schaap *et al.*, 2004; Weinberg *et al.*, 2003). U lidí byly popsány tři běžné haplotypy APOA5 charakterizované polymorfismů -1131C/T (rs662799) a 56G/C (rs3135506). Varianty -1131C a 56G, jsou asociovány s hypertriglyceridémií (Wang *et al.*, 2008).

Studie, které se zabývaly vlivem výše zmíněných polymorfismů v APOA5 na průběh postprandiální lipémie, nepřinesly jednoznačný závěr. Některé studie vliv polymorfismu APOA5 na postprandiální triglyceridémii neprokázaly (Martin *et al.*, 2003; Masana *et al.*, 2003), některé prokázaly (Jang *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2006). Rozdílné nálezy můžeme vysvětlit například odlišnostmi ve složení experimentálního jídla, způsobu testování a charakteristikou probandů. Všechny studie jako pokusné jídlo používají složené jídlo – tedy experimentální jídlo složené z tuků i sacharidů. Žádná studie netestovala pouze tukovou zátěž.

Cílem této části mé práce bylo analyzovat efekt genotypu v APOA5 na průběh postprandiální lipémie v souboru dobrovolníků, který byl sledován v předchozí kapitole. Současně jsme zjišťovali, zda je případný efekt genotypu ovlivněn složením pokusného jídla (75 g tuku vs. 75 g tuku + 25 g glukózy).

## 4.2 Materiál a metody

Studie byla provedena na stejném souboru dobrovolníků jako v předchozí kapitole 3. Vliv glukózy na průběh postprandiální lipémie. U těchto dobrovolníků byly stanoveny polymorfismy -1131C/T a 56G/C.

### 4.2.1 Stanovení polymorfismu APOA5

#### 4.2.1.1 Izolace DNA

Z plné krve byla izolována DNA vysolovací metodou podle Miller (Miller *et al.*, 1988). Koncentrace a čistota vzorků DNA byla změřena na spektrofotometru (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, USA). Vzorky byly naředěny pomocí deionizované H<sub>2</sub>O aby výsledná koncentrace vzorku byla v rozsahu 50-100 ng/ml.

#### 4.2.1.2 Genotypizace APOA5

Polymorfismy APOA5 byly stanoveny pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a následnou restrikční analýzou. Fragmenty PCR produktů byly separovány elektroforézou na 3% agarózovém gelu. Výsledné fragmenty byly zobrazeny UV transluminátorem (Hubacek *et al.*, 2004).

#### Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Mix pro PCR (25 µl) obsahoval:

- 1 µl DNA
- 2,5 µl pufru
  - PCR pufr - zásobní roztok 10x koncentrovaný - 500mM Tris-HCl (pH = 9,1), 160mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 25mM MgCl<sub>2</sub>, BSA (1,5 mg/ml)
- 2,5 µl dNTP's
  - deoxynukleotidy Fermentas (ThermoFisher Scientific, USA) - zásobní roztok o koncentraci 2 mmol/l pro každý dNTP
- 1,5 µl směsi primerů (použité primery jsou uvedeny v Tab. 6)
  - primery - směs forward a reverse primeru o koncentraci 0,01 mmol/l
- 0,1 µl polymeráza Taq Fermentas (ThermoFisher Scientific, USA)
- 17,4 µl vody



**Tab. 6: Sekvence primerů použitých při APOA5 genotypizaci.**

SNP	Forward / reverse primer	Restrikční enzym
rs662799	5' GATTGATTCAAGATGCATTTAGGAC 5' CCCCAGGAACTGGAGCGAAATT	TruII
rs3135506	5' TGCTCACCTGGGCTCTGGCTCTTC 5' CCAGAAGCCTTTCCGTGCCTGGGCGGC	Eco52I

Primery byly vyrobeny na zakázku firmou Generi Biotech, Česká republika.

PCR proběhla v termocykléru DNA Engine Dyad Dual-Bay Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, USA). Teplotní profil PCR reakce je uveden v Tab. 7.

**Tab. 7: Teplotní profil PCR reakce.**

	rs662799			rs3135506		
	teplota	čas	počet opakování	teplota	čas	počet opakování
denaturace	96 °C	3 min		96 °C	3 min	
denaturace	95 °C	20 s		95 °C	20 s	
nasednutí primerů	57,5 °C	30 s	35x	64 °C	30 s	35x
elongace	72 °C	30 s		72 °C	30 s	
terminační elongace	72 °C	3 min		72 °C	3 min	
ochlazení	10 °C	30 s		10 °C	30 s	

### Restrikční analýza

Reakční směs (20 µl) pro restrikční analýzu SNP rs662799 obsahovala:

- 2 µl pufru TruII Fermentas (ThermoFisher Scientific, USA)
- 1 µl restriktázy TruII Fermentas (ThermoFisher Scientific, USA)
- 7 µl vody
- 10 µl PCR produktu.

Reakční směs byla inkubována 3 hodiny při 65 °C v biologickém termostatu BT120 (Laboratorní přístroje, Československo).

Reakční směs (20 µl) pro restriční analýzu SNP rs3135506 obsahovala:

- 2 µl pufru Eco52I Fermentas (ThermoFisher Scientific, USA)
- 1 µl restriktázy Eco52I Fermentas (ThermoFisher Scientific, USA)
- 7 µl vody
- 10 µl PCR produktu.

Reakční směs byla přes noc inkubována v termocykléru při 37 °C.

#### 4.2.2 Statistické zpracování výsledků

Rozdíly mezi skupinami heterozygotů (HT) a „wild type“ WT po podání T a T+G snídaně byly stanoveny dvoufaktorovou analýzou rozptylu (ANOVA) pro opakovaná měření (JMP® 10.0.0, SAS Institute Inc.). Rozdíly mezi T a T+G snídání byly hodnoceny párovým t-testem v programu GraphPad Instat 3. Plochy pod křivkou (AUC) a plochy pod přírůstkovou křivkou (AUIC) byly porovnány pomocí párového t-testu nebo jeho neparametrického analogu v programu GraphPad Instat 3. Pro parametry vykazující významné změny jen v průběhu prvních 120 minut jsme hodnotili dvouhodinové AUC a AUIC a pro zbývající parametry jsme porovnávali osmihodinové AUC a AUIC.

Výsledky jsou prezentovány jako průměr ± směrodatná odchylka (SD).

### 4.3 Výsledky

Z celkového souboru 30 dobrovolníků byli 3 dobrovolníci heterozygotní pro variantu 56G a 7 dobrovolníků pro variantu -1131C. Pro analýzu výsledků byli nositelé obou minoritních haplotypů spojeni do jedné skupiny heterozygoti (skupina HT). Zbývajících 20 dobrovolníků bylo nositeli „wild type“ variant 56C a -1131T pro oba polymorfismy (skupina WT).

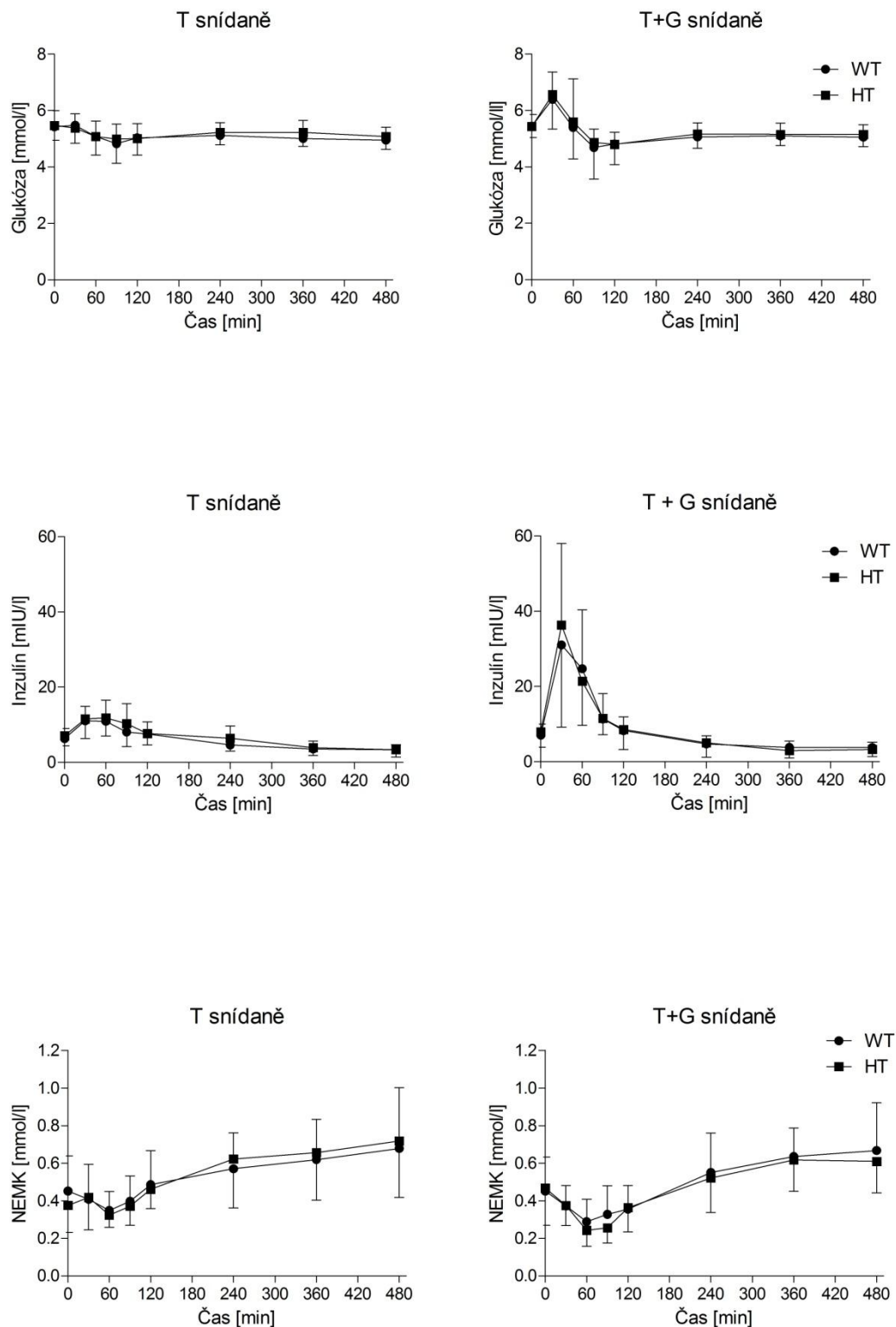
Skupina HT a WT dobrovolníků se od sebe nelišila v základních parametrech (Tab. 8).

**Tab. 8: Charakteristika dobrovolníků podle genotypu.**

	heterozygoti (HT)	„wild type“ (WT)	t-test
Počet (n)	10	20	
Věk [roky]	33,5 ± 8,0	34,5 ± 8,3	n.s.
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	26,9 ± 3,8	25,6 ± 2,0	n.s.
Cholesterol [mmol/l]	4,41 ± 0,85	4,41 ± 0,71	n.s.
Triacylglyceroly [mmol/l]	1,22 ± 0,53	1,05 ± 0,46	n.s.
Glukóza [mmol/l]	5,50 ± 0,48	5,43 ± 0,43	n.s.
NEMK [mmol/l]	0,42 ± 0,18	0,45 ± 0,18	n.s.

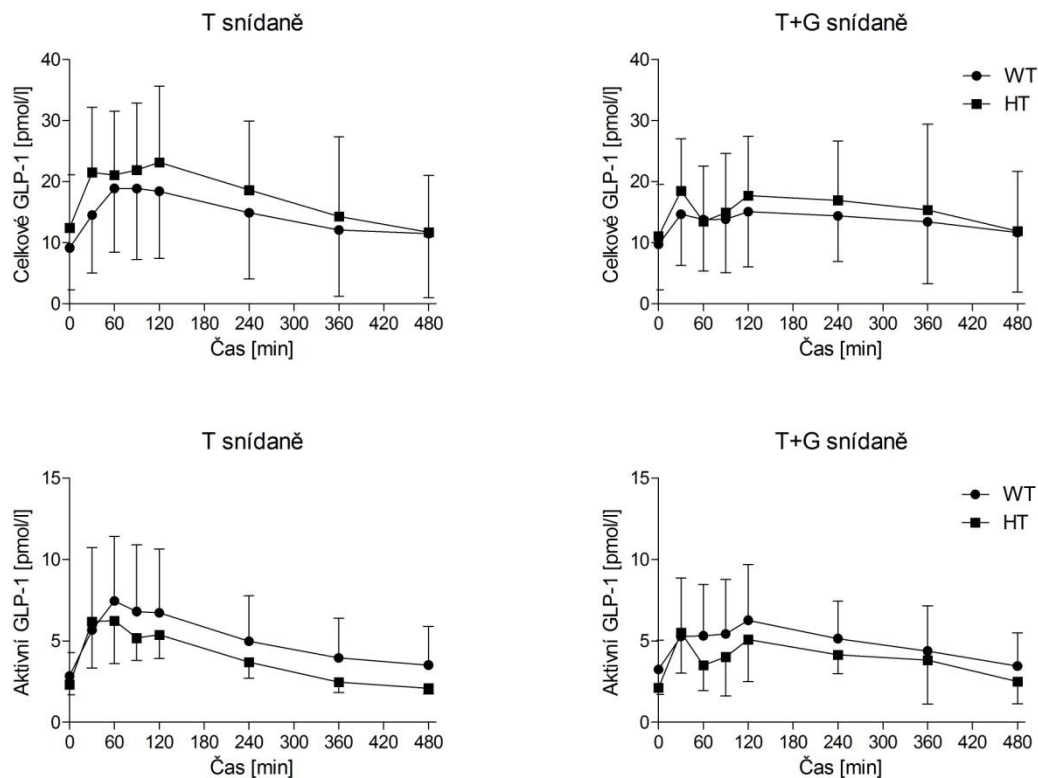
Data jsou prezentována jako průměr ± SD.

V průběhu glykémie, inzulinémie a koncentrace NEMK nebyly prokázány rozdíly mezi oběma sledovanými skupinami HT a WT po podání T i T+G snídaně (Obr. 26). Koncentrace celkového i aktivního GLP-1 se rovněž nelišila mezi HT a WT skupinami (Obr. 27). V souladu s tím nebyly prokázány žádné rozdíly v efektu genotypu (HT vs. WT) na plochy pod křivkou (AUC) a přírůstkové plochy pod křivkou (AUC) těchto parametrů (Tab. 9).



**Obr. 26: Koncentrace glukózy, inzulínu a NEMK u HT a WT.**

Koncentrace glukózy, inzulínu a neesterifikovaných mastných kyselin (NEMK) se mezi skupinami heterozygotů (HT) a „wild type“ (WT) po podání 75 g tuku (T snídaně) i 75 g tuku + 25 g glukózy (T+G snídaně) statisticky významně nelišily. Hodnoceno pomocí dvoufaktorové ANOVA pro opakovaná měření pro porovnání mezi oběma skupinami.



**Obr. 27: Koncentrace celkového a aktivního GLP-1 u HT a WT.**

Koncentrace celkového a aktivního glukagonu podobného peptidu (GLP-1) se mezi skupinami heterozygotů (HT) a „wild type“ (WT) po podání 75 g tuku (T snídaně) i 75 g tuku + 25 g glukózy (T+G snídaně) statisticky významně nelišily. Hodnoceno pomocí dvoufaktorové ANOVA pro opakovaná měření pro porovnání mezi oběma skupinami.

**Tab. 9: Dvouhodinová plocha pod křivkou (2h AUC) a dvouhodinová přírůstková plocha pod křivkou (2h AUIC) pro vybrané parametry.**

		2h AUC		p	2h AUIC		p
		[mmol*l/h]		(pár. t-test)	[mmol*l/h]		(pár. t-test)
	Genotyp	T	T+G	p	T	T+G	p
Glukóza	WT	10,31	10,80	0,108	-0,54	- 0,08	0,042
		± 1,01	± 1,54		± 0,53	± 1,07	
	HT	10,40	11,07	0,067	-0,71	0,20	0,040
		± 0,95	± 1,31		±0,61	± 1,32	
	t-test	0,817	0,621		0,461	0,570	
Inzulín	WT	18,50	37,40	< 0,001	5,82	23,39	< 0,001
		± 6,46	± 18,38		± 4,79	± 15,02	
	HT	20,55	38,76	< 0,001	6,42	22,86	0,001
		± 7,45	± 15,80		±4,20	± 13,07	
	t-test	0,469	0,835		0,731	0,921	
NEMK	WT	0,81	0,70	0,118	-0,09	-0,21	0,032
		± 0,24	±0,19		±0,25	±0,29	
	HT	0,77	0,65	0,052	0,01	-0,29	0,005
		± 0,18	± 0,15		± 0,22	±0,30	
	t-test	0,568	0,424		0,252	0,481	
Celkové GLP-1	WT	33,76	27,34	< 0,001	14,8	7,85	0,006
		± 18,71	± 16,21		± 9,24	± 5,61	
	HT	41,14	30,62	< 0,001	16,33	8,53	< 0,001
		± 19,98	± 17,48		± 6,61	± 7,07	
	t-test	0,344	0,626		0,608	0,794	
Aktivní GLP-1	WT	12,36	10,39	0,014	6,66	3,90	0,003
		± 6,81	± 5,82		± 5,24	± 4,35	
	HT	10,73	8,33	0,009	6,10	4,09	0,040
		± 2,78	± 3,35		± 2,94	± 3,07	
	t-test	0,363	0,229		0,711	0,892	

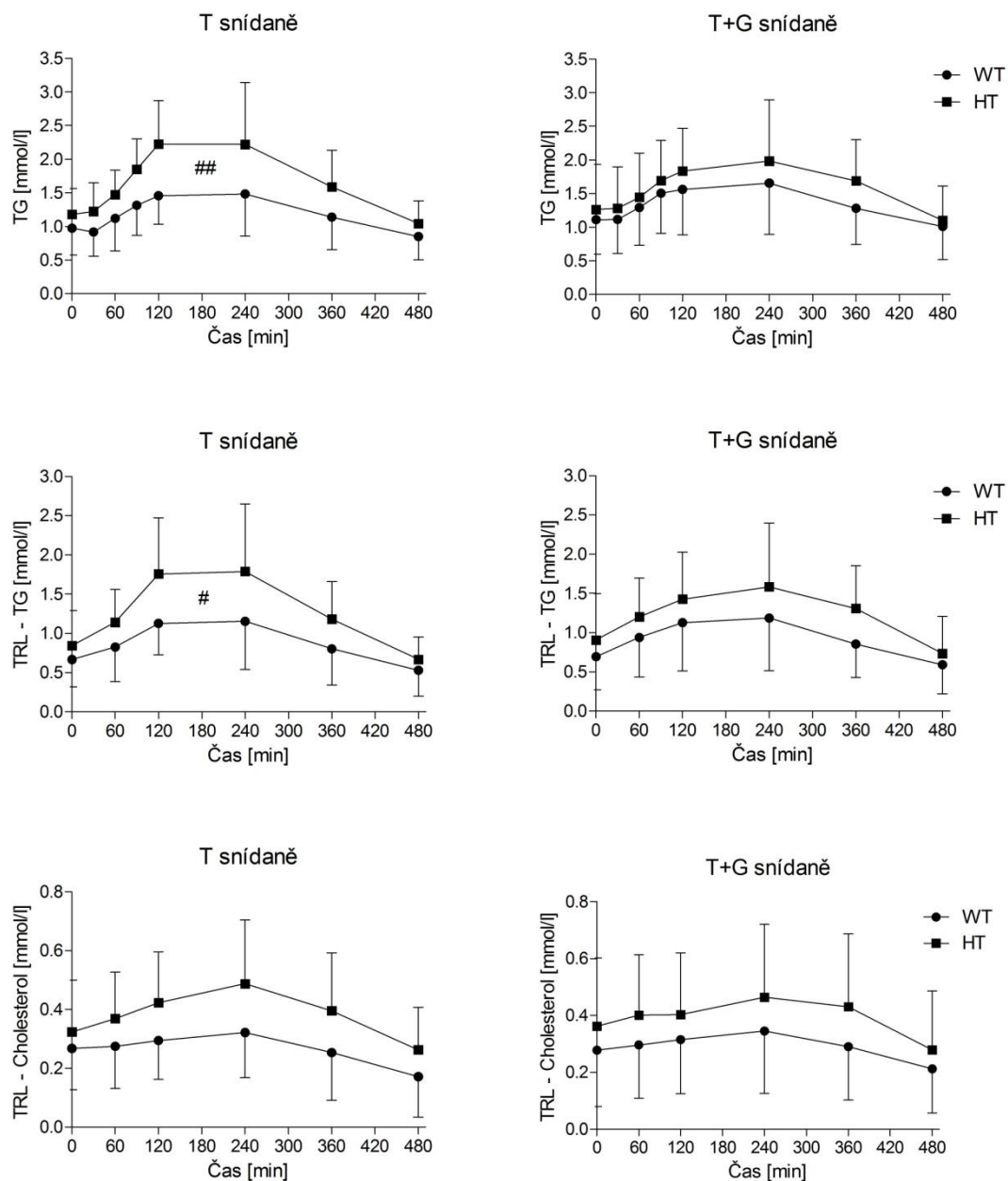
Data jsou prezentována jako průměr ± SD (HT: n = 10; WT: n = 20).

AUC - plocha pod křivkou; AUIC - plocha pod přírůstkovou křivkou.

Hodnoceno parametrickým t-testem a párovým t-testem.

V experimentu, ve kterém byla dobrovolníkům podána pouze tuková zátěž (T snídane), se lišil průběh postprandiální triglyceridémie mezi WT a HT ( $p = 0,01$ ; dvoufaktorová ANOVA pro opakovaná měření). V souladu s tím byly u HT statisticky významně zvýšeny AUC TG a AUIC TG po podání T snídane (Obr. 28, Tab. 10). Pokud byla dobrovolníkům podána tuková zátěž spolu s 25 g glukózy, nebyly mezi skupinami HT a WT zjištěny statisticky významné rozdíly v průběhu postprandiální triglyceridémie ani ve velikosti ploch pod křivkou (AUC) TG.

Srovnatelné výsledky byly nalezeny i pro koncentraci TRL-TG a TRL-C. Pouze rozdíly v AUC a AUIC TRL-C nedosáhly statistické významnosti.



Obr. 28: Koncentrace TG, TRL-TG a TRL-C u HT a WT.

##  $p < 0,01$ ; #  $p < 0,05$  (dvoufaktorová ANOVA pro opakovaná měření pro porovnání mezi oběma genotypy).



**Tab. 10: Plocha pod křivkou (AUC) a přírůstková plocha pod křivkou (AUC) pro vybrané parametry během postprandiální lipémie.**

		8h AUC		p	8h AUC		p
		[mmol*l/h]		(pár. t-test)	[mmol*l/h]		(pár. t-test)
	Genotyp	T	T+G	p	T	T+G	p
<b>TG</b>	WT	9,84	11,08	0,184	2,03	2,16	0,674 <sup>§</sup>
		±3,32	±4,50		±2,39	±1,68	
	HT	14,01	13,28	0,151	4,58	3,16	0,084 <sup>§</sup>
		±4,27	±4,94		±2,13	±2,18	
	t-test	0,016	0,253		0,005 <sup>§§</sup>	0,222	
<b>TRL - TG</b>	WT	7,29	7,65	0,282	1,96	2,09	0,834
		±3,01	±3,83		±2,16	±1,43	
	HT	10,80	10,31	0,577	4,05	3,05	0,282
		±4,25	±4,39		±1,70	±1,97	
	t-test	0,035	0,122		0,008	0,192	
<b>TRL -C</b>	WT	2,17	2,39	0,287	0,03	0,17	0,559
		±1,01	±1,49		±0,65	±0,60	
	HT	3,20	3,26	0,800	0,60	0,36	0,222
		±1,42	±1,84		±0,75	±0,77	
	t-test	0,063	0,217		0,056	0,496	

Data jsou prezentována jako průměr ± SD (HT: n = 10; WT: n = 20).

AUC - plocha pod křivkou; AUC - plocha pod přírůstkovou křivkou.

Hodnoceno parametrickým t-testem.

§ Wilcoxonův párový test.

§§ Mann-Whitneyův test.

Nebyly zjištěny žádné rozdíly v koncentraci plazmatické LPL, která byla stanovena v poheparinové plazmě 8 hodin po podání experimentální snídani (Tab. 11).

**Tab. 11: Koncentrace lipoproteinové lipázy (LPL) v poheparinové plazmě.**

LPL [ng/ml]	heterozygoti	„wild type“	t-test
T+G snídani	498 ± 93	505 ± 108	0,852
T snídani	446 ± 56	490 ± 108	0,150
t-test	0,061	0,470	

Data jsou prezentována jako průměr ± SD (HT: n = 10; WT: n = 20).

#### 4.4 Diskuze

Postprandiální lipémie je významně vyšší u nositelů varianty -1131C nebo 56G v *APOA5* (skupina heterozygoti) po požití samotného tuku v porovnání se skupinou „wild type“. Přidání 25 g glukózy k tukové zátěži rozdíl mezi heterozygoty a „wild type“ potlačuje.

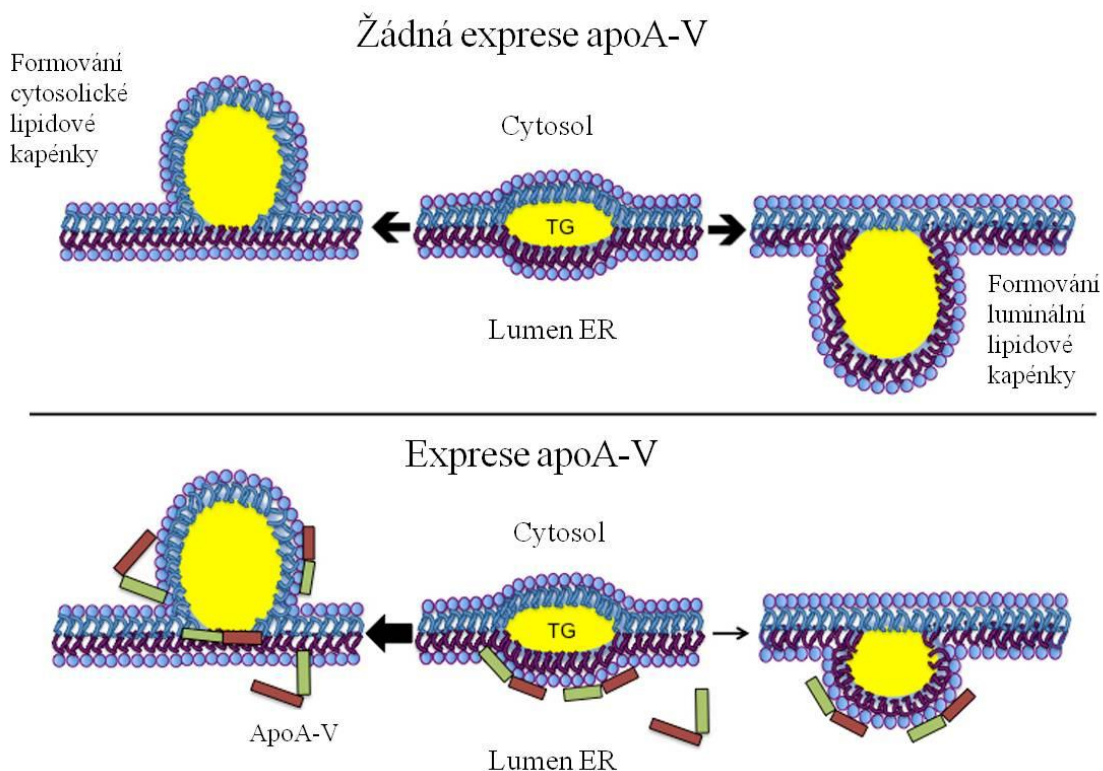
V našem souboru 30 dobrovolníků byli 3 dobrovolníci heterozygotní pro variantu 56G a 7 dobrovolníků bylo heterozygotních pro variantu -1131C. Vzhledem k malému počtu probandů jsme nositele obou minoritních SNP (haplotypů) pro analýzu spojili do jedné skupiny heterozygotů (skupina HT). Je známo, že oba minoritní haplotypy jsou asociovány se zvýšenou triglyceridémií a nositelé obou variant -1131C a 56G secernují z jater stejný maturovaný protein jako „wild type“. Cytosin u nositelů varianty -1131C se nachází v promotorové části genu a tryptofan v pozici 19 u nositelů varianty 56G je součástí signálního peptidu, který je odstraněn z apoA-V před sekrecí proteinu. Lze předpokládat, že nositelé obou variant mají v cirkulaci sníženou koncentraci apoA-V oproti WT. Promotorová varianta -1131C je spojena se sníženou transkripcí proteinu (Palmen *et al.*, 2008) a konformační změna signálního peptidu spojená s variantou 56G vede ke snížené translokaci apoA-V do ER a tedy i ke snížení sekrece (Talmud *et al.*, 2005). V souladu s tím byla u normotriglyceridemických nositelů těchto variant zjištěna nižší koncentrace apoA-V v plazmě než u nositelů WT (Hahne *et al.*, 2008; Ishihara *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2013; Palmen *et al.*, 2008; Talmud *et al.*, 2005). Studie, které našly zvýšenou koncentraci apoA-V u nositelů těchto variant, byly provedeny u pacientů s hypertriglyceridémií (Hahne *et al.*, 2008; Henneman *et al.*, 2007). Tento paradox lze vysvětlit tak, že u těchto pacientů se v cirkulaci hromadí TRL, na kterých je apoA-V transportováno. Protože jedním z kritérií pro zařazení dobrovolníka do naší studie byla koncentrace lačných TG nižší než 2,5 mmol/l, nelišila se triglyceridémie u HT dobrovolníků od triglyceridémie WT dobrovolníků (Tab. 8). Lze tedy předpokládat, že v naší studii byla koncentrace apoA-V u HT probandů v plazmě snížena. Z finančních důvodů ale nebylo možné změřit koncentraci apoA-V v plazmě.

Opakovaně bylo ukázáno, že nositelé -1131C a 56G mají zvýšenou koncentraci plazmatických TG v porovnání s nositeli varianty WT (Pennacchio *et al.*, 2001; Pennacchio *et al.*, 2002; Vrablik *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2008). Navzdory značnému úsilí, které bylo věnováno studiu apoA-V, doposud nebylo jednoznačně vysvětleno jak

varianty v *APOA5* mohou zvyšovat triglyceridémii. Předpokládají se dva mechanismy účinku:

1. ApoA-V zvyšuje katabolismus TRL částic v cirkulaci tím, že zvyšuje aktivitu LPL a napomáhá vazbě TRL částic k endotelu (Fruchart-Najib *et al.*, 2004; Merkel *et al.*, 2005b; Shu *et al.*, 2010). V souladu s tím by mohl být i náš nález, že postprandiální lipémie je zvýšena u HT po podání samotného tuku, pokud je u nich nižší koncentrace apoA-V v cirkulaci než u WT. Není však jasné, proč stejný efekt nepozorujeme, je-li tuková zátěž podána spolu s glukózou. Je třeba poznamenat, že studie zabývající se vlivem apoA-V na aktivitu LPL byly provedeny za nefyziologických podmínek - na transgenních zvířatech nebo při koncentracích apoA-V výrazně vyšších, než je fyziologická koncentrace apoA-V v plazmě. Koncentrace apoA-V v lidském séru je více než řádově nižší než koncentrace jiných apolipoproteinů a pohybuje se od 114 do 258 ng/ml u normolipemických subjektů (Forte *et al.*, 2009; O'Brien *et al.*, 2005). Koncentrace apoA-V je přibližně 10x menší než koncentrace VLDL, a přibližně 300x nižší než koncentrace apoC-II, což je hlavní kofaktor LPL. Doposud chybí jednoznačné důkazy, že fyziologická koncentrace apoA-V může významně ovlivnit aktivitu LPL *in vivo*. Je tedy velmi nepravděpodobné, že by fyziologické změny koncentrace apoA-V podmíněné genetickou variabilitou mohly významně ovlivnit rychlost lipolýzy TRL částic v cirkulaci.

2. ApoA-V redukuje sekreci VLDL. Tento mechanismus byl navržen Weinbergem a kol. (Weinberg *et al.*, 2003) a potvrzen v experimentech *in vitro* (Schaap *et al.*, 2004). Je v souladu s pozorováním, že *APOA5* je up-regulován v časně fázi regenerace jater po 70% hepatektomii u potkana (van der Vliet *et al.*, 2001) – v této fázi hepatocyty potřebují využít TG, resp. mastné kyseliny jako zdroje energie. Detailní mechanismus inhibice sekrece VLDL prostřednictvím apoA-V byl studován v buněčné kultuře na buňkách hepatocelulárního karcinomu potkana (McA-RH7777) (Gao *et al.*, 2012). Nové lipidové kapénky vznikají mezi dvěma fosfolipidovými vrstvami membrány endoplazmatického retikula (ER). Uvnitř této dvojvrstvy vzniká kapénka TG, která postupně zvětšuje svou velikost. Takto vznikající lipidová kapénka může směřovat buď do cytosolu (cytosolická tuková kapénka), nebo do lumen ER, kde fúzuje se vznikající částicí VLDL, která je poté secernována. Gao a kol. ukázali, že apoA-V směřuje nově vznikající tukové kapénky do cytosolu hepatocytů (Obr. 29). Mezi expresí apoA-V a sekrecí TG je tedy inverzní vztah a mezi expresí apoA-V a formováním cytosolických kapének je pozitivní korelace (Sharma *et al.*, 2012).



**Obr. 29: Model zobrazující cestu jaterních triacylglycerolů (TG).**

V nepřítomnosti apolipoproteinu A-V (apoA-V) (horní panel - žádná exprese apoA-V) se z triacylglycerolů (TG) mezi membránami endoplazmatického retikula formují tukové kapénky, které směřují buď do cytosolu. Nebo alternativně směřují do lumen endoplazmatického retikula, odkud jsou následně secernovány jako lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL).

V přítomnosti apoA-V (spodní panel - exprese apoA-V) se z TG mezi membránami endoplazmatického retikula tvoří cytosolické lipidové kapénky, které slouží buňce jako zdroj energie.

Převzato z (Gao *et al.*, 2012).

Přítomnost apoA-V v lumen ER tedy směřuje lipidové kapénky do cytosolu hepatocytů. Tomuto mechanismu funkce apoA-V by odpovídal i náš nále. Nositelé variant -1131C a 56G v *APOA5*, kteří secernují méně apoA-V, by tedy mohli secernovat více VLDL-TG z jater než skupina WT. Zvýšená sekrece VLDL-TG z jater u skupiny HT by tedy vysvětlila vyšší postprandiální triglyceridémii po podání samotné tukové zátěže. Protože bazální hladina TG se mezi skupinou HT a WT nelišila, rozdíl v postprandiální triglyceridémii lze tedy přičíst zvýšené produkci VLDL u skupiny HT.

Otázkou však zůstává, proč je rozdíl v postprandiální triglyceridémii eliminován přidáním relativně malého množství glukózy (25 g) k tukové zátěži.

Přidání glukózy k tukové zátěži vyvolalo mírný nárůst glykémie a fyziologicky očekávanou odpověď inzulinu. Inzulín snižuje expresi *APOA5* prostřednictvím fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K), která fosforylací upstream stimulačních faktorů (USFs) inhibuje expresi *APOA5*. To bylo potvrzeno ve studii u mužů, kde

experimentálně navozená hyperinzulinémie snižovala koncentraci apoA-V v plazmě po 3,5 hodinách (Nowak *et al.*, 2005). Je ale nepravděpodobné, že by regulace genové exprese *APOA5* mohla mít hlubší dopad na ranou fázi postprandiální triglyceridémie. Navíc, jiná práce *in vitro* od stejného kolektivu autorů ukazuje, že glukóza *per se* aktivuje expresi *APOA5* (Nowak *et al.*, 2008). Není tedy zcela jasné, zda přidání glukózy k tukové zátěži může ovlivnit sekreci apoA-V.

Dalším možným mechanismem vysvětlujícím tento nálezn je, že inzulin inhibuje hormon senzitivní lipázu (HSL) a tak inhibuje lipolýzu v tukové tkáni. To vede ke snížení koncentrace plazmatických NEMK, které jsou určujícím faktorem pro produkci VLDL-TG v játrech. Inzulin tedy potlačuje produkci VLDL-TG. U normálních i obézních jedinců byl v euglykemickém hyperinzulinemickém klempu pozorován konzistentní pokles v produkci VLDL-TG, neboť hyperinzulinémie vyvolala rychlý a dramatický pokles koncentrace plazmatických NEMK (Lewis *et al.*, 1993). Je tedy možné, že supresivní efekt inzulinu na jaterní sekreci VLDL může převážít roli apoA-V v regulaci sekrece VLDL v postprandiální fázi. Z tohoto důvodu by podání glukózy a následná hyperinzulinémie mohly snižovat rozdíly v rozsahu postprandiální lipémie mezi HT a WT subjekty.

Naše nálezy vyzdvihují roli genotypu *APOA5* a složení experimentálního jídla pro testování postprandiální lipémie. Tyto výsledky mohou přispět k vysvětlení rozdílných výsledků studií, které analyzovaly vliv variant -1131C a 56G na postprandiální lipémii. Nicméně je třeba zdůraznit, že ve studiích, které detekovaly rozdíly mezi nositeli těchto variant a kontrolními subjekty, bylo použito „mixed meal“, které indukuje inzulinovou odpověď (Jang *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2006). I v naší studii byl po podání tuku s glukózou rozsah postprandiální triglyceridémie o 20 % vyšší u HT než u WT, ale tento rozdíl nebyl statisticky významný ( $p = 0,222$ , Tab. 10). Je otázkou, zda by při zvětšení velikosti souboru na úroveň srovnatelnou s citovanými pracemi nebylo rovněž dosaženo statisticky významného rozdílu. Je také možné, že efekt variant v *APOA5* na rozsah postprandiální lipémie v těchto studiích by mohl být výraznější, pokud by byla použita pouze tuková zátěž. Na druhé straně existují studie, které podobně jako naše studie po podání „mixed meal“ vliv polymorfismu *APOA5* na průběh postprandiální lipémie nepotvrdily (Martin *et al.*, 2003; Masana *et al.*, 2003). Rozdílné nálezy můžeme vysvětlit například odlišnostmi ve složení experimentálního jídla (různé množství podaného cukru a tuku) a charakteristikou probandů (rozdílný

věk, pohlaví, rasa a hmotnost subjektů). Žádná studie ale netestovala pouze tukovou zátěž.

Z našich výsledků můžeme uzavřít, že postprandiální triglyceridémie je zvýšená u nositelů variant -1131C nebo 56G v *APOA5* po podání 75 g tuku. Přidáním 25 g glukózy, která vyvolá fyziologickou odpověď inzulínu, dochází k potlačení rozdílů v rozsahu postprandiální triglyceridémie mezi heterozygoty a „*wild-type*“ nositeli variant *APOA5*.

## 5. Postprandiální lipémie a ateroskleróza hodnocená neinvazivními klinickými metodami

### 5.1 Úvod

Postprandiální lipémie je zvýšená a prolongovaná u pacientů s kardiovaskulárními onemocněními ve srovnání se zdravými kontrolami (Patsch *et al.*, 1992). Dosud však nebyly provedeny prospektivní studie, které by umožnily zhodnotit úlohu zvýšené postprandiální lipémie jako rizikového faktoru a vzhledem k náročnosti podobného typu studií je jejich realizace poměrně obtížná. Lze předpokládat, že zvýšená postprandiální lipémie je asociována s preklinickými projevy aterosklerotického poškození cév, které lze v současné době hodnotit i neinvazivními metodami jako je stanovení endoteliální dysfunkce, tloušťky intimy-medie a kalciového skóre, případně s projevy postižení cévní stěny nezávislými na aterosklerotickém procesu, tedy arteriální tuhostí.

Za první potencionálně reverzibilní projev aterosklerózy je považována dysfunkce endotelu. Endotel je monovrstva buněk, která se nachází na vnitřním povrchu všech krevních a lymfatických cév. Principem stanovení endoteliální dysfunkce je měření vasodilatační schopnosti tepen na standardní podnět, například změny arteriálního tonu - PAT (periferní arteriální tonus = „*peripheral arterial tone*“) použitím pletyzmografických metod. V tomto případě jsou změny postokluzního tonu v periferním řečišti hodnoceny jako reaktivní hyperemický index (RHI = „*reactive hyperemic index*“) (Axtell *et al.*, 2010). Bylo zjištěno, že toto stanovení endoteliální (dys)funkce predikuje výskyt kardiovaskulárních příhod (Rubinshtein *et al.*, 2010).

Tuhost cévní stěny, kterou můžeme vyjádřit rychlostí šíření pulzní vlny (PWV = „*pulse wave velocity*“), představuje další nezávislý kardiovaskulární rizikový faktor. Pulzní vlna vzniká při vypuzení krve z levé komory, šíří se cévní stěnou od aorty až k periférii. PWV charakterizuje rigiditu příslušného úseku tepenného řečiště – čím rychleji se tlaková vlna šíří, tím tužší je studovaná céva. Princip vyšetření spočívá ve stanovení časového posunu ( $\Delta t$ ) začátku tlakové vlny mezi dvěma místy, které jsou od sebe ve vzdálenosti  $D$ . Rychlost šíření pulzní vlny se vypočítá jako poměr vzdálenosti ( $D$ ) a časového posunu ( $\Delta t$ ). Výsledná hodnota je uváděna v metrech za sekundu. Jednotlivé pulzní vlny jsou snímány transkutánně pomocí sondy tonometru. Měření se provádí za současného monitorování EKG. Při tomto měření se časový posun

jednotlivých pulzových vln určuje ve vztahu k R-kmitu na EKG záznamu (Filipovsky *et al.*, 2000).

Standardním a stále nejčastěji používaným ukazatelem preklinické aterosklerózy zůstává měření tloušťky intimy-medie na karotických arteriích ultrazvukem s vysokou rozlišovací schopností (Bauer *et al.*, 2012) i když v posledních doporučeních Evropské společnosti pro aterosklerózu a Evropské kardiologické společnosti (EAS/ESC) je spíše doporučováno hodnotit přítomnost plátů (Catapano *et al.*, 2016). Tloušťka intimy-medie (IMT) karotických tepen byla stanovena již zavedenou standardní metodou (Pitha *et al.*, 2013). Zvýšené hodnoty IMT významně korelují s výskytem koronárních a mozkových příhod (Bots *et al.*, 1997; Pitha, 2007; Riley, 2004). Nicméně, vzhledem k výše zmíněným doporučením EAS/ESC jsme hodnotili přítomnost aterosklerotických změn i semikvantitativně – včetně přítomnosti plátů pomocí ultrazvukového vyšetření tzv. Belcaro skóre (Belcaro *et al.*, 1991; Belcaro *et al.*, 1996).

Měření kalciového skóre je založeno na faktu, že vápník se ve zdravých srdečních tepnách nehromadí, a jeho akumulace indikuje přítomnost koronárního onemocnění. Kalciové skóre koronárních tepen hodnotí úroveň jejich kalcifikace jako známky koronární aterosklerózy a je silným nezávislým prediktorem výskytu ischemické choroby srdeční (Budoff *et al.*, 2007; Detrano *et al.*, 2008; Erbel *et al.*, 2010). Stanovení kalciového skóre je prováděno počítačovou tomografií (CT) srdce ve vysokém rozlišení a s EKG synchronizací se zaměřením na koronární artérie. Radiační zátěž tohoto vyšetření je nízká.

Studie byla provedena na souboru postmenopauzálních žen bez manifestní ischemické choroby srdeční (ICHS) a kardiovaskulárního onemocnění (KVO). Tato věková skupina žen je rizikovou skupinou, která je ohrožena vznikem a rychlou progresí aterosklerotických změn. Primárním cílem této studie bylo zjistit, zda u postmenopauzálních žen postprandiální triglyceridémie hodnocená 4 hodiny po definované zátěži (Kolovou *et al.*, 2011) může predikovat preklinickou aterosklerózu hodnocenou neinvazivními diagnostickými metodami. Dalším cílem bylo porovnat prediktivní sílu postprandiální triglyceridémie s dalšími klasickými rizikovými faktory jako je např. vysoký krevní tlak, koncentrace LDL-C, cholesterolu a další.



## 5.2 Materiál a metody

### 5.2.1 Uspořádání experimentu u pacientů

Vyšetření bylo provedeno u 73 postmenopauzálních žen (věk:  $59,6 \pm 3,8$  let; BMI:  $26,8 \pm 4,9$  kg/m<sup>2</sup>). Dobrovolnice byly informovány o rizicích spojených s odběry krve a rentgenovým vyšetřením a podepsaly informovaný souhlas. Každá žena s pomocí zdravotní sestry vyplnila zdravotní dotazník, zaměřený na rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění, na otázky reprodukčního věku, medikace a dalších sledovaných parametrů.

Vyšetření bylo provedeno na Pracovišti preventivní kardiologie v IKEM. Nejprve bylo provedeno vyšetření endoteliální dysfunkce. Poté byl proveden zátěžový tukový test, při kterém ženy obdržely pokusnou snídani, která obsahovala 75 g tuku (225 ml 30% šlehačky, Meggle) a 25 g glukózy. Krev pro stanovení sledovaných parametrů byla odebrána před a 4 hodiny po podání pokusné snídane. V plazmě byla stanovena koncentrace TG, cholesterolu, HDL-cholesterolu (HDL-C), LDL-cholesterolu (LDL-C), neesterifikovaných mastných kyselin (NEMK), glukózy, inzulinu a apolipoproteinu B-48 (apoB-48). Ze vzorků byly ultracentrifugací (při hustotě  $d = 1,006$  g/ml) izolovány a charakterizovány lipoproteiny transportující triacylglyceroly (TRL). V TRL frakci byla stanovena koncentrace TG (TRL-TG), cholesterolu (TRL-C). Byla vypočtena koncentrace remnantního cholesterolu (RChol) podle vzorce  $RChol = \text{cholesterol} - HDL-C - LDL-C$  (Nordestgaard & Freiberg, 2011). V průběhu vyšetření postprandiální lipémie byla provedena sonografická vyšetření tloušťky intimy-medie a arteriální tuhosti a po jeho ukončení bylo provedeno vyšetření kalciového skóre. Stanovení endoteliální dysfunkce bylo provedeno na lačno, protože požití šlehačky by mohlo ovlivnit měření. Bylo ukázáno, že hodnota RHI po tukové zátěži byla významně nižší (Westerink *et al.*, 2013).

### 5.2.2 Klinická neinvazivní vyšetření

#### 5.2.2.1 Vyšetření endoteliální dysfunkce

Endoteliální dysfunkce byla neinvazivně stanovena pomocí přístroje Endo-PAT 2000 (Itamar, Izrael), kdy je stanoven RHI („*reactive hyperemia index*“). Vyšetření bylo prováděno v samostatné, tiché a stabilně vyhřáté místnosti. Při stanovení endoteliální dysfunkce byly účastnice studie v klidu na lůžku. Nejprve byl dobrovolnicím změřen krevní tlak na tonometru SL500 (Huntleigh Healthcare, Velká

Británie) a poté byl umístěn jednorázový neinvazivní PAT senzor na ukazováčky obou rukou. Měření se skládá ze 3 fází, kdy každá fáze trvá 5 minut. První fáze je klidová. Při druhé fázi dojde k okluzi na nedominantní ruce. Okluze je provedena nafouknutím manžety tonometru o 60 mm Hg nad hodnotu systolického tlaku pacientky. Třetí fáze je zahájena uvolněním manžety a měří se odezva PAT signálu. U funkčního endotelu by mělo dojít k vazodilataci. Získané signály jsou pomocí softwaru převedeny na RHI (Axtell *et al.*, 2010). Za normální hodnoty RHI jsou považovány hodnoty vyšší než 2,07 (Tab. 12).

**Tab. 12: Vyhodnocení parametru RHI.**

RHI	Nález
< 1,67	Endoteliální dysfunkce
1,67–2,07	„Šedá zóna“ – pacient je ohrožen vznikem endoteliální dysfunkce v budoucnosti
> 2,07	Normální endoteliální funkce – fyziologický nález

### 5.2.2.2 Vyšetření arteriální tuhosti

Rychlost šíření pulzní vlny (PWV) byla stanovena na přístroji SphygmoCor (AtCor Medical LTD, Austrálie). Dobrovolnice během vyšetření ležely na vyšetřovacím lůžku. Nejprve byl u dobrovolnice nahmatán pulz karotidy v úrovni hlasivek a metrem byla změřena vzdálenost od tohoto místa k horní části sternu. V tříselné oblasti byl nahmatán pulz femorální tepny a metrem byla změřena vzdálenost od tohoto místa k horní části sternu. Údaje o vzdálenostech byly zadány do příslušného softwaru. Při vyšetření byly dobrovolnice zapojeny na 3 svodové sondy EKG, které byly umístěny na hrudníku (kvůli správnému zaznamenání R křivky). Poté byl pomocí tonometru naměřen puls karotidy a femorální tepny po dobu 10 - 30 vteřin. U každé dobrovolnice byly změřeny 2 hodnoty PWV a pro analýzu byl použit průměr těchto hodnot. Hodnoty nad 10 m/s jsou považovány za patologické (Van Bortel *et al.*, 2012).

### 5.2.2.3 Vyšetření tloušťky intimy-medie

Tloušťka intimy-medie (IMT) byla stanovena při ultrazvukovém vyšetření krčních tepen na přístroji Toshiba Aplio SX UV SSA-79A. Při vyšetření ženy ležely na vyšetřovacím lůžku. Vyšetření u všech žen prováděl zkušený lékař. Tloušťka IMT byla měřena na pravé i levé karotické tepně v úseku přibližně 10 mm proximálně od bifurkace společné karotické artérie. K dalším analýzám byl použit průměr obou měření. Jako definice aterosklerotického plátu se používá hodnota lokálního zesílení

IMT větší než 1,2–1,5 mm (Pitřha, 2007). Při sonografickém vyšetření krčních tepen bylo stanoveno i zmíněné Belcaro skóre (Tab. 13), což je klasifikace založená na hodnocení změn IMT, morfologie intimy-medie, a na přítomnosti a velikosti aterosklerotických plátů (Belcaro *et al.*, 1991; Belcaro *et al.*, 1996). Rovněž byla sonograficky změřena tloušťka podkožního tuku standardním způsobem v poloze vleže na zádech, těsně nad pupční jizvou sondou 7-10 MHz, používanou i k měření aterosklerotických změn na karotických tepnách.

**Tab. 13: Klasifikace preklinické aterosklerózy dle Belcara, tzv. Belcaro skóre**

Převzato z (Belcaro *et al.*, 1996).

<b>Třída</b>	<b>Morfologie krkavice zobrazená ultrazvukem</b>
<b>I</b>	Normální - 3 vrstvy (intima-media, adventitia, periadventitia) jsou zřetelně odděleny. Rozhraní lumen-intima není narušeno alespoň 3 cm, mohou se vyskytovat počáteční změny (narušení rozhraní lumen-intima < 0,5 cm).
<b>II</b>	Granulace intimy-medie a/nebo ztlustění vrstvy intimy-medie (> 1 mm)
<b>III</b>	Hemodynamicky nevýznamný plát. IMT > 2 mm
<b>IV</b>	Stenotický plát, který snižuje průsvit tepny > 50 %.

#### 5.2.2.4 Stanovení kalciového skóre

Stanovení kalciového skóre, které hodnotí úroveň koronární kalcifikace jako známky koronární aterosklerózy, bylo provedeno počítačovou tomografií (CT) srdce ve vysokém rozlišení a s EKG synchronizací se zaměřením na koronární artérie na přístroji Siemens HeartView CT. Kalcifikace v koronárních artériích byly hodnoceny pomocí Siemens Calcium scoring software (O'Rourke *et al.*, 2000), kterým je zjišťováno tzv. Agatstonovo kalciové skóre (Tab. 14) (Agatston *et al.*, 1990). Vyšetření bylo provedeno v IKEM na oddělení výpočetní tomografie, magnetické rezonance a klinické experimentální spektroskopie ZRIR a vyhodnoceno specializovaným pracovníkem.

**Tab. 14: Referenční hodnoty pro Agatstonovo kalciové skóre**

Převzato z (Agatston *et al.*, 1990).

Neidentifikovatelné kalcifikace	Minimálně identifikovatelné kalcifikace	Drobné kalcifikace	Mírně významné kalcifikace	Významné kalcifikace
0	1 - 10	11 - 100	101 - 400	401 a více

### 5.2.3 Statistické zpracování výsledků

Byly použity metody korelační a regresní analýzy, které jsou detailně popsány v kapitole 5. 3 Výsledky.

### 5.3 Výsledky

Základní charakteristika vyšetřovaného souboru postmenopauzálních žen je shrnuta v Tab. 15. Normální BMI ( $20\text{--}25\text{ kg/m}^2$ ) mělo 30 žen (41,1 %), nadváhu ( $25\text{--}30\text{ kg/m}^2$ ) mělo 26 žen (35,6 %), obezitou ( $> 30\text{ kg/m}^2$ ) trpělo 15 žen (20,5 %) a pouze 2 ženy (2,8 %) měly podváhu ( $< 20\text{ kg/m}^2$ ). Podle definice metabolického syndromu (Alberti *et al.*, 2009) je u žen rizikovým faktorem abdominální obezita při obvodu pasu vyšším nebo rovném 88 cm – tuto hranici v našem souboru překročilo 41 žen (56,2 %). U 29 žen (39,7 %) byl naměřen krevní tlak vyšší nebo roven 130/85 (rizikový faktor metabolického syndromu), z toho 13 žen se léčilo pro hypertenzi. Z celkového souboru 73 žen bylo 13 kuřáček.

**Tab. 15: Základní charakteristika souboru sledovaných žen.**

Charakteristika	Průměr ± SD
Věk [roky]	59,7 ± 3,8
BMI [ $\text{kg/m}^2$ ]	26,8 ± 4,9
Obvod pasu [cm]	90,6 ± 12,2
Obvod boků [cm]	104,7 ± 10
WHR	0,9 ± 0,1
SBP	126 ± 13
DBP	73 ± 7
Podkožní tuk [mm]	20,6 ± 7,5

WHR - poměr pasu k bokům; SBP - systolický krevní tlak; DBP - diastolický krevní tlak  
Data jsou prezentována jako průměr ± SD.

Průměrný věk, kdy u žen nastala menopauza, byl  $47,9 \pm 6$  let, průměrná délka postmenopauzy byla  $11,7 \pm 6,7$  let. Nejnižší věk menopauzy byl 28 let (prodělaná hysterektomie a oboustranná ovariectomie), nejvyšší věk menopauzy byl 55 let (přirozená menopauza) a medián věku menopauzy byl 50 let. Hysterektomii (chirurgické odstranění dělohy) podstoupilo 11 žen, 13 žen podstoupilo hysterektomii a ovariectomii (chirurgické odstranění vaječníku). V době experimentu užívalo 6 žen substituční terapii a 15 žen užívalo substituční terapii v minulosti.

Výsledky vyšetření sledovaných parametrů jsou shrnuty v Tab. 16. Lačná hodnota cholesterolu vyšší než 5 mmol/l byla nalezena u 55 žen (75,3 %), z toho pouze 2 ženy užívaly v minulosti statiny. Nejvyšší hladina lačného cholesterolu byla 7,37 mmol/l a naopak nejnižší hladina cholesterolu byla 3,97 mmol/l. Medián lačné koncentrace cholesterolu byl 5,35 mmol/l. Koncentrace LDL-C byla měřena přímo (ne výpočtem), lačnou hodnotu LDL-C vyšší než 3 mmol/l mělo 54 žen (74 %). Mezi rizikové faktory metabolického syndromu patří koncentrace lačného HDL-C u žen nižší než 1,3 mmol/l, to bylo zjištěno u 23 žen (31,5 %). Lačná hodnota koncentrace TG vyšší nebo rovna 1,7 mmol/l byla nalezena u 13 žen (17,8 %). Lačná hladinu glykémie vyšší nebo rovna 5,6 mmol/l byla nalezena u 36 žen (49,3 %). Průměrný homeostatický index inzulinové rezistence (HOMA-IR) byl  $2,13 \pm 1,36$ . Hodnota HOMA-IR 2,68, která je považována za horní hranici normálních hodnot, byla zvýšena u 17 žen (23,3 %).

Po podání tukové zátěže došlo k vzestupu průměrné koncentrace TG o 69 %, koncentrace TRL-TG dokonce o 107 %, koncentrace TRL-C vzrostla o 33 %, koncentrace NEMK stoupla o 41 %, koncentrace inzulinu vzrostla o 23 %. LDL-cholesterol poklesl o 3 %, HDL-cholesterol poklesl o 5 %, glykémie poklesla o 5 %. Hladina celkového cholesterolu se významně nezměnila.

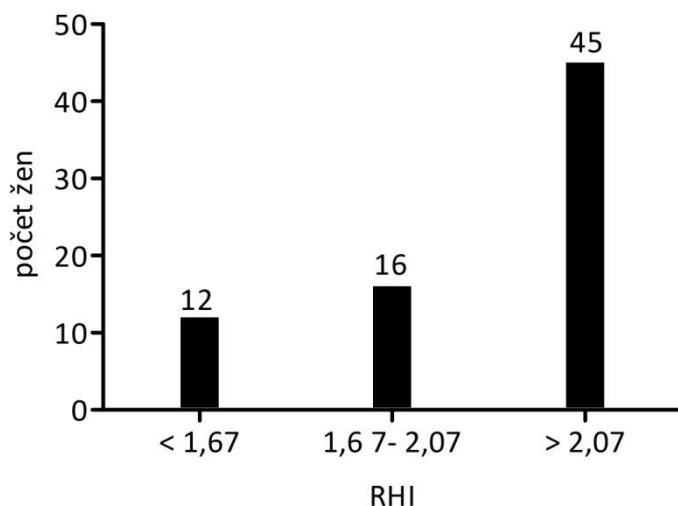
**Tab. 16: Změna parametrů 4 hodiny po podání tukové zátěže.**

	0 h	4 h	$\Delta$	t-test
TG [mmol/l]	$1,26 \pm 0,57$	$2,13 \pm 1,10$	$0,87 \pm 0,71$	0,000
Cholesterol [mmol/l]	$5,52 \pm 0,84$	$5,55 \pm 0,84$	$0,03 \pm 0,26$	0,346
HDL-C [mmol/l]	$1,52 \pm 0,44$	$1,45 \pm 0,42$	$-0,07 \pm 0,19$	0,002
LDL-C [mmol/l]	$3,64 \pm 0,83$	$3,52 \pm 0,82$	$-0,12 \pm 0,24$	0,000
NEMK [mmol/l]	$0,46 \pm 0,23$	$0,65 \pm 0,23$	$0,20 \pm 0,30$	0,000
Glukóza [mmol/l]	$5,67 \pm 0,69$	$5,40 \pm 0,67$	$-0,26 \pm 0,55$	0,000
TRL-TG[mmol/l]	$0,73 \pm 0,48$	$1,51 \pm 0,97$	$0,78 \pm 0,62$	0,000
TRL-C [mmol/l]	$0,30 \pm 0,22$	$0,40 \pm 0,26$	$0,10 \pm 0,11$	0,000
Inzulín [uIU/ml]	$8,28 \pm 4,75$	$10,15 \pm 7,83$	$3,73 \pm 7,10$	0,028
ApoB-48 [mg/l]	$7,42 \pm 3,87$	$10,78 \pm 5,69$	$3,45 \pm 3,80$	0,000

Data jsou prezentována jako průměr  $\pm$  SD.

### 5.3.1 Hodnocení endoteliální dysfunkce

Průměrná hodnota reaktivního hyperemického indexu (RHI) u všech 73 žen byla  $2,31 \pm 0,59$ . Distribuce hodnot RHI dle doporučených hodnot je znázorněna na Obr. 30.

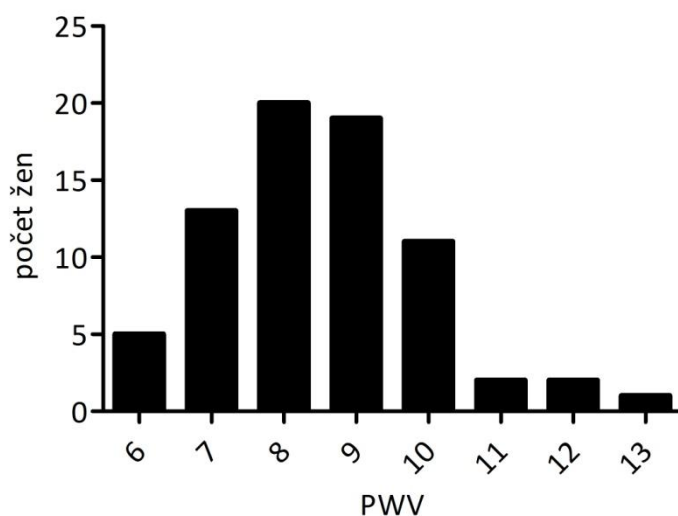


Obr. 30: Distribuce hodnot RHI.

U 45 žen byl naměřen RHI  $> 2,07$ , tedy normální endoteliální funkce, u 16 žen byl naměřen RHI v rozmezí tzv. šedé zóny tj. 1,67-2,07, endoteliální dysfunkce (RHI  $< 1,67$ ) byla naměřena u 11 žen ( $n = 73$ ).

### 5.3.2 Hodnocení arteriální tuhosti

Průměrná rychlost pulzní vlny (PWV) u všech 73 žen byla  $8,50 \pm 1,41$  m/s. Distribuce hodnot PWV je znázorněna na Obr. 31.



Obr. 31: Distribuce hodnot PWV.

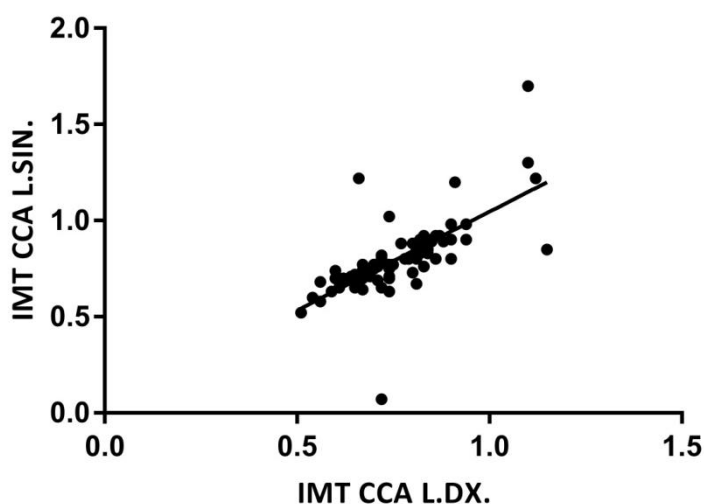
### 5.3.3 Hodnocení tloušťky intimy-medie

Zjištěné hodnoty IMT v pravé i levé karotidě (Tab. 17) byly vysoce významně korelovány  $r = 0,682$ ,  $p < 0,0001$  (Obr. 32) a proto byla pro analýzy použita průměrná hodnota IMT z obou karotid.

**Tab. 17:** Výsledky vyšetření tloušťky intimy-medie.

	[mm]
IMT cca. l. dx.	$0,76 \pm 0,13$
IMT cca. l. sin	$0,80 \pm 0,20$
Průměrná IMT	$0,78 \pm 0,15$

Data jsou prezentována jako průměr  $\pm$  SD ( $n = 72$ ).



**Obr. 32:** Korelace tloušťky pravé a levé karotidy.

$r = 0,682$   $p < 0,001$  ( $n = 72$ ).

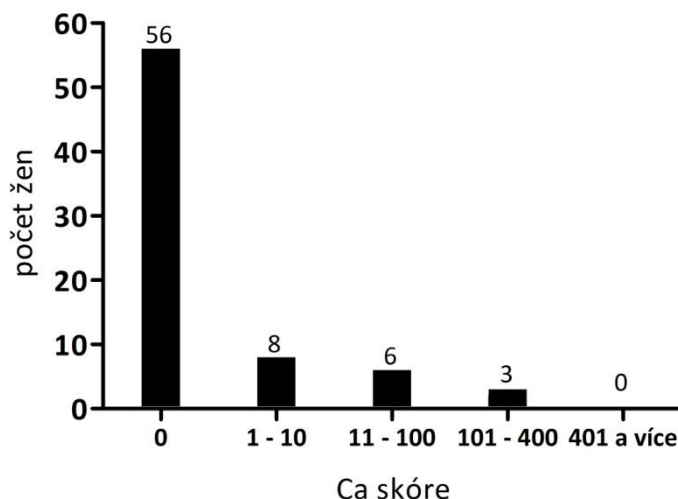
Průměrná hodnota Belcaro skóre byla  $1,82 \pm 0,68$ . U 30,6 % žen bylo skóre I, hodnota skóre I-II byla nalezena u 15,3 % žen, hodnotu skóre II splňovalo 20,5 % žen, hodnota II-III byla nalezena u 26,4 % žen, skóre III dosáhlo 6,9 % žen, skóre III-IV a IV nebylo zjištěno (Tab. 18).

**Tab. 18:** Hodnocení Belcaro skóre.

Belcaro skóre	I	I - II	II	II - III	III	III - IV	IV
	(1)	(1,5)	(2)	(2,5)	(3)	(3,5)	(4)
Počet žen	22	11	15	19	5	0	0

### 5.3.4 Hodnocení kalciového skóre

Ze 73 vyšetřených žen bylo u 56 (76,7 %) nalezeno kalciové skóre 0. U 18 žen byly hodnoty vyšší, jejich distribuci ukazuje Obr. 33.



**Obr. 33: Distribuce kalciového skóre.**

U 56 žen nebyly nalezeny kalcifikace (Ca skóre = 0), u 8 žen byly nalezeny minimálně identifikovatelné kalcifikace (Ca skóre = 1–10), u 6 žen byly nalezeny drobné kalcifikace (Ca skóre = 11–100), u 3 žen byly nalezeny mírně významné kalcifikace (Ca skóre = 101–400) a u žádné ženy nebyla nalezena významná kalcifikace (Ca skóre = 401 a více) (n = 73).

Korelace výsledků klinických neinvazivních vyšetření s biochemickými parametry lipidového spektra je zobrazena v Tab. 19. Parametry postprandiální lipémie nevykázaly žádný vztah s RHI. U PWV byla nalezena statisticky významná korelace s lačnou koncentrací TG (TG 0h) (Obr. 34), s koncentrací TG měřenou 4 h po podání tukové zátěže (TG 4h) (Obr. 35), korelace s remnantním cholesterolem v čase 0 h a 4 h (RChol 0h, RChol 4h). U tloušťky intimy-medie (IMT) byla nalezena pouze hraniční korelace s remnantním cholesterolem měřeným v čase 4h (RChol 4h). U hodnocení Belcaro skóre byla nalezena hraniční korelace s lačnými i postprandiálními TG (TG 0h a TG 4h), hraniční korelace s koncentrací remnantního cholesterolu v čase 0h a statisticky významná korelace v čase 4h (RChol 4h).

U PWV byla nalezena i statisticky významná korelace s TRL-TG v čase 0h a 4h, rovněž Belcaro skóre statisticky významně koreluje s TRL-TG v čase 0 a hraničně významně s TRL-TG v čas 4h.

U klasických rizikových faktorů byla nalezena statisticky významná korelace pouze mezi systolickým krevním tlakem (SBP) a PWV a RHI, a mezi věkem a PWV a Belcaro skórem, a hraničně významná korelace mezi věkem a RHI a IMT.



Hodnoty kalciového skóre nebyly korelovány, protože u více jak 75 % žen se rovnalo 0.

**Tab. 19: Korelace výsledků klinických neinvazivních vyšetření se sledovanými parametry.**

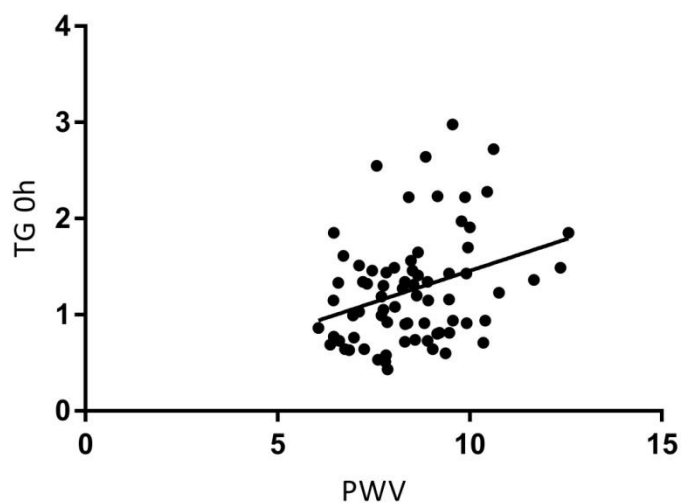
	RHI		PWV		IMT		Belcaro skóre	
	r	p	r	p	r	p	r	p
TG 0h	- 0,111	0,350	0,323	0,005	0,041	0,730	0,220	0,063
TG 4h	- 0,128	0,281	0,278	0,017	0,106	0,374	0,229	0,053
Δ TG	- 0,107	0,368	0,167	0,157	0,129	0,280	0,174	0,143
RChol 0h	0,101	0,396	0,288	0,014	0,198	0,096	0,211	0,075
RChol 4h	0,038	0,749	0,305	0,009	0,226	0,056	0,254	0,031
Δ RChol	- 0,060	0,616	0,152	0,199	0,131	0,273	0,161	0,176
Chol 0h	- 0,056	0,637	0,017	0,884	0,083	0,486	- 0,062	0,608
NEMK 0h	0,155	0,189	0,171	0,148	0,050	0,674	- 0,006	0,962
HDL-C 0h	0,115	0,331	-0,085	0,475	- 0,020	0,868	- 0,085	0,479
LDL-C 0h	- 0,152	0,199	-0,036	0,765	0,027	0,821	- 0,090	0,453
TRL-C 0h	-0,129	0,277	0,291	0,013	0,101	0,396	0,187	0,117
TRL-C 4h	-0,185	0,117	0,264	0,024	0,105	0,381	0,185	0,120
ΔTRL-C	-0,187	0,114	0,048	0,687	0,048	0,690	0,069	0,567
TRL-TG 0h	-0,159	0,180	0,307	0,008	0,069	0,563	0,254	0,031
TRL-TG 4h	-0,154	0,194	0,256	0,029	0,108	0,364	0,213	0,073
ΔTRL-TG	-0,118	0,321	0,162	0,170	0,116	0,332	0,136	0,253
BMI	- 0,017	0,885	0,031	0,792	0,182	0,125	0,164	0,170
SBP	0,229	0,051	0,376	0,001	0,016	0,891	0,140	0,242
DBP	- 0,185	0,116	0,124	0,294	- 0,039	0,745	- 0,051	0,669
Pas	- 0,054	0,653	0,155	0,195	0,137	0,254	0,123	0,306
Věk	0,210	0,074	0,344	0,003	0,196	0,099	0,364	0,002

Remnantní cholesterol - RChol = Cholesterol – HDL-C – LDL-C

SBP = systolický krevní tlak

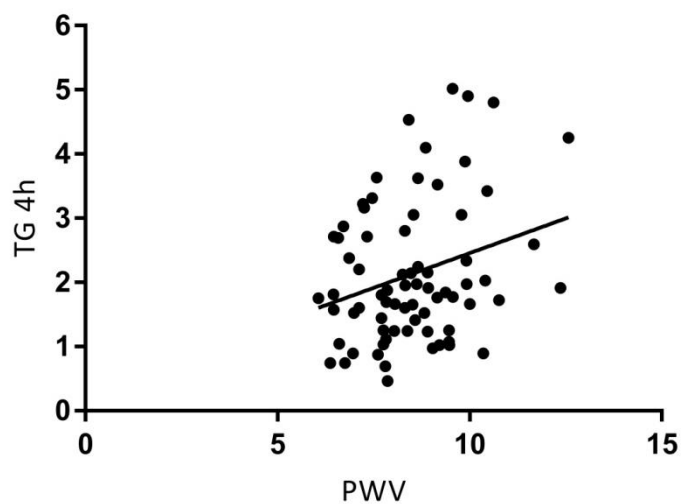
DBP = diastolický krevní tlak

r = Pearsonův korelační koeficient



**Obr. 34: Korelace mezi PWV a mezi lačnou koncentrací TG (TG 0h).**

$r = 0,3228$ ,  $p = 0,0053$ ,  $n = 73$ .



**Obr. 35: Korelace mezi PWV a postprandiální koncentrací TG (TG 4h).**

$r = 0,2779$ ,  $p = 0,0173$ ,  $n = 73$ .

Parametry související s postprandiální lipémií korelovaly konzistentně pouze s PWV a proto jsme se soustředili na analýzu jednotlivých parametrů postprandiální lipémie v predikci PWV pomocí mnohonásobné lineární regrese. V základním modelu byly zahrnuty následující parametry: pas, věk, délka menopauzy, SBP, LDL-C, HDL-C a HOMA-IR. V tomto modelu věk a SBP vysvětlují 23 % variace rychlosti šíření pulzní vlny (Tab. 20; Tab. 21).

**Tab. 20: Regresní funkce pro rychlost pulzní vlny (PWV) - základní model.**

Proměnná	Regresní koeficient	SE	95% konfidenční interval
konstanta	- 3,098	3,335	- 9,766 – + 3,570
pas	+ 0,011	0,017	- 0,02291 – + 0,04443
věk	+ 0,103	0,048	+ 0,0076 – + 0,1988
menopauza	- 0,030	0,027	- 0,08348 – + 0,02377
SBP	+ 0,036	0,013	+ 0,009423 – + 0,06209
LDL-C	+ 0,009	0,201	- 0,3920 – + 0,4096
HDL-C	+ 0,168	0,415	- 0,6617 – + 0,9983
HOMA-IR	- 0,0132	0,146	- 0,3059 – + 0,2795

SBP - systolický krevní tlak, LDL-C - LDL cholesterol, HDL-C - HDL cholesterol, HOMA-IR - homeostatický index inzulinové rezistence

**Tab. 21: Staticky významné regresory pro rychlost pulzní vlny (PWV) - základní model**

Proměnná	t	p	Významnost
věk	2,158	0,035	ano
SBP	2,715	0,009	ano

SBP - systolický krevní tlak

V tomto základním modelu jsme zjišťovali, zda predikci variace PWV zlepší zařazení dalších parametrů: TG, TRL-TG, TRL-C, RChol, apoB-48 hodnocených v čase 0 nebo 4 hodiny nebo jako přírůstek koncentrace po podání tukové zátěže, zlepší predikci variace PWV (Tab. 22).

**Tab. 22: Příspěvek analyzovaných proměnných k základnímu regresnímu modelu.**

Proměnná	R <sup>2</sup>	Statisticky významné prediktory PWV
zákl. model	23,0 %	SBP (p = 0,009), věk (p = 0,035)
+ TG <sub>0</sub>	29,6 %	SBP (p = 0,009), TG <sub>0</sub> (p = 0,020)
+ TG <sub>4</sub>	25,8 %	SBP (p = 0,007)
+ ΔTG	23,5 %	SBP (p = 0,009)
+ RChol <sub>0</sub>	29,0 %	SBP (p = 0,010), věk (p = 0,023), RChol <sub>0</sub> (p = 0,027)
+ RChol <sub>4</sub>	26,6 %	SBP (p = 0,012), věk (p = 0,044)
+ ΔRChol	23,2 %	SBP (p = 0,010), věk (p = 0,043)
+ TRL-TG <sub>0</sub>	28,7 %	SBP (p = 0,006), TRL-TG <sub>0</sub> (p = 0,031)
+ TRL-TG <sub>4</sub>	25,4 %	SBP (p = 0,008)
+ ΔTRL-TG	23,4 %	SBP (p = 0,009)
+ TRL-C <sub>0</sub>	28,0 %	SBP (p = 0,008), TRL-C <sub>0</sub> (p = 0,044)
+ TRL-C <sub>4</sub>	25,8 %	SBP (p = 0,009)
+ ΔTRL-C	23,1 %	SBP (p = 0,009)
+ apoB-48 <sub>0</sub>	24,7 %	SBP (p = 0,010), věk (p = 0,038)
+ apoB-48 <sub>4</sub>	24,9 %	SBP (p = 0,009), věk (p = 0,049)
+ ΔapoB-48	22,6 %	SBP (p = 0,013)

SBP - systolický krevní tlak

Predikci PWV o 5–6 % zlepšilo zařazení koncentrace TG, TRL-TG, TRL-C, a RChol stanovených nalačno, zařazení stejných parametrů stanovených 4 hodiny po podání tukové zátěže ani přírůstku těchto parametrů nemělo tak výrazný vliv na predikci PWV. Zařazení koncentrace apoB-48 nemělo zásadní dopad na zlepšení predikce.

Protože koncentrace triacylglycerolů (TG) je klinicky nejsnáze dostupný lipidový parametr, rozdělili jsme dále soubor žen na skupiny podle toho, zda splňují lačnou koncentraci TG odpovídající definici metabolického syndromu a odpovědi postprandiální lipémie. Podle definice metabolického syndromu (Alberti *et al.*, 2009) je jedním z rizikových faktorů lačná koncentrace TG vyšší nebo rovna 1,7 mmol/l. Pro další analýzu jsme skupinu žen tedy rozdělili podle lačné koncentrace TG do skupiny ve zvýšeném riziku ( $TG \geq 1,7$  mmol/l) a ostatní ženy. Ženy v rizikové skupině ( $TG \geq 1,7$  mmol/l) měly statisticky významně vyšší rychlost pulzní vlny (PWV) a statisticky významně vyšší Belcaro skóre. Hodnota IMT byla vyšší u žen v rizikové skupině, ale rozdíl nedosáhl statistické významnosti a hodnota RHI se mezi skupinami nelišila. Zároveň měly ženy v rizikové skupině statisticky významně nižší koncentraci HDL-cholesterolu (HDL-C). U žen v rizikové skupině byla nalezena vyšší hodnota HOMA-IR, která se blížila statistické významnosti (Tab. 23).

**Tab. 23: Porovnání skupin postmenopauzálních žen podle hodnoty lačné koncentrace TG.**

	TG < 1,7 mmol/l (n = 60)	TG ≥ 1,7 mmol/l (n = 13)	p
RHI	2,32 ± 0,61	2,24 ± 0,54	0,641
PWV [m/s]	8,29 ± 1,30	9,48 ± 1,50	0,005
IMT [mm]	0,77 ± 0,15	0,84 ± 0,15	0,080
Belcaro skóre	1,73 ± 0,65	2,23 ± 0,67	0,022
Cholesterol [mmol/l]	5,48 ± 0,79	5,73 ± 1,06	0,779
LDL-C [mmol/l]	3,61 ± 0,77	3,78 ± 1,08	0,497
HDL-C [mmol/l]	1,59 ± 0,43	1,22 ± 0,32	0,005
SBP	125,6 ± 12,9	128,2 ± 14,5	0,516
DBP	73,2 ± 7,6	74,2 ± 5,8	0,644
HOMA-IR	1,99 ± 1,28	2,76 ± 1,60	0,085
TG 0h [mmol/l]	1,05 ± 0,33	2,24 ± 0,39	< 0,001
TG 4h [mmol/l]	1,77 ± 0,72	3,81 ± 0,96	< 0,001
TRL-TG 0h [mmol/l]	0,55 ± 0,27	1,55 ± 0,39	< 0,001
TRL-TG 4h [mmol/l]	1,21 ± 0,66	2,91 ± 0,99	< 0,001
TRL-C 0h [mmol/l]	0,23 ± 0,12	0,67 ± 0,20	< 0,001
TRL-C 4h [mmol/l]	0,32 ± 0,17	0,79 ± 0,26	< 0,001
RChol 0h [mmol/l]	0,28 ± 0,22	0,73 ± 0,26	< 0,001
RChol 4h [mmol/l]	0,47 ± 0,30	1,09 ± 0,32	< 0,001

Podle doporučení Kolovou a kol. (Kolovou *et al.*, 2011) je adekvátní koncentrace po tukovém tolerančním testu menší nebo rovna 2,5 mmol/l. Pro další analýzu jsme skupinu žen rozdělili na skupinu s adekvátní odpovědí (TG 4h  $\leq$  2,5 mmol/l) a skupinu se zvýšenou odpovědí postprandiálních TG. Statisticky významně se tyto skupiny nelišily v žádném klinickém neinvazivním vyšetření. Skupina žen s adekvátní odpovědí postprandiální triglyceridémie měla statisticky významně vyšší koncentraci lačného HDL-cholesterolu. Zároveň u žen ve skupině s adekvátní odpovědí byla nalezena nižší hodnota HOMA-IR a nižší koncentrace LDL-C, která se blížila statistické významnosti (Tab. 24).

**Tab. 24: Porovnání skupin postmenopauzálních žen podle hodnoty postprandiální koncentrace TG.**

	<b>TG 4h <math>\leq</math> 2,5 mmol/l (n = 51)</b>	<b>TG 4h &gt; 2,5 mmol/l (n = 22)</b>	<b>p</b>
RHI	2,34 $\pm$ 0,62	2,23 $\pm$ 0,52	0,473
PWV [m/s]	8,38 $\pm$ 1,30	8,77 $\pm$ 1,67	0,281
IMT [mm]	0,78 $\pm$ 0,16	0,80 $\pm$ 0,14	0,629
Belcaro skóre	1,75 $\pm$ 0,67	1,98 $\pm$ 0,68	0,234
Cholesterol [mmol/l]	5,43 $\pm$ 0,81	5,73 $\pm$ 0,89	0,164
LDL-C [mmol/l]	3,53 $\pm$ 0,77	3,90 $\pm$ 0,91	0,080
HDL-C [mmol/l]	1,62 $\pm$ 0,44	1,29 $\pm$ 0,34	0,002
SBP	125,7 $\pm$ 13,1	126,9 $\pm$ 13,4	0,736
DBP	73,0 $\pm$ 7,8	74,2 $\pm$ 6,3	0,538
HOMA-IR	1,97 $\pm$ 1,32	2,51 $\pm$ 1,40	0,076
TG 0h [mmol/l]	1,01 $\pm$ 0,33	1,85 $\pm$ 0,58	< 0,001
TG 4h [mmol/l]	1,52 $\pm$ 0,48	3,54 $\pm$ 0,77	< 0,001
TRL-TG 0h [mmol/l]	0,51 $\pm$ 0,27	1,25 $\pm$ 0,48	< 0,001
TRL-TG 4h [mmol/l]	0,98 $\pm$ 0,41	2,75 $\pm$ 0,75	< 0,001
TRL-C 0h [mmol/l]	0,20 $\pm$ 0,10	0,55 $\pm$ 0,22	< 0,001
TRL-C 4h [mmol/l]	0,26 $\pm$ 0,12	0,72 $\pm$ 0,21	< 0,001
RChol 0h [mmol/l]	0,28 $\pm$ 0,22	0,54 $\pm$ 0,32	< 0,001
RChol 4h [mmol/l]	0,41 $\pm$ 0,26	0,97 $\pm$ 0,33	< 0,001

Velmi dobrým prediktorem KVO u postmenopauzálních žen je EWET indikátor („*Enlarged Waist combined with Elevated Triglycerides*“). EWET kombinuje zvýšený obvod pasu větší nebo roven 88 cm se zvýšenými TG většími nebo rovnými 1,45 mmol/l (Tanko *et al.*, 2005). V našem souboru splňovalo kritéria EWET 14 žen (19,2 %). Ženy s pozitivním EWET měly statisticky významně vyšší tloušťku intimy-medie, vyšší hodnotu Belcaro skóre, nižší lačnou koncentraci HDL-C a vyšší hodnotu HOMA-IR. U žen s negativním EWET byla nalezena hraničně významná nižší PWV (Tab. 25).

**Tab. 25: Porovnání skupin postmenopauzálních žen podle EWET indikátoru.**

	<b>+ EWET (n = 14)</b>	<b>- EWET (n = 59)</b>	<b>p</b>
RHI	2,24 ± 0,66	2,32 ± 0,58	0,666
PWV [m/s]	9,07 ± 1,66	8,37 ± 1,32	0,093
IMT [mm]	0,85 ± 0,15	0,77 ± 0,15	0,026
Belcaro skóre	2,21 ± 0,64	1,73 ± 0,65	0,022
Cholesterol [mmol/l]	5,68 ± 1,08	5,49 ± 0,78	0,867
LDL-C [mmol/l]	3,76 ± 1,03	3,61 ± 0,78	0,542
HDL-C [mmol/l]	1,25 ± 0,42	1,59 ± 0,42	0,008
SBP	129 ± 15	125 ± 13	0,357
DBP	73 ± 6	74 ± 8	0,654
HOMA-IR	3,10 ± 2,20	1,90 ± 0,96	0,042
TG 0h [mmol/l]	1,99 ± 0,41	1,09 ± 0,46	< 0,001
TG 4h [mmol/l]	3,43 ± 1,03	1,82 ± 0,86	< 0,001
RChol 0h [mmol/l]	0,67 ± 0,25	0,29 ± 0,24	< 0,001
RChol 4h [mmol/l]	1,02 ± 0,31	0,48 ± 0,32	< 0,001

## 5.4 Diskuze

V této studii zabývající se postprandiální lipémií u postmenopauzálních žen, které jsou rizikovou skupinou potenciálně ohroženou ICHS a KVO, jsme pozorovali asociaci mezi lačnou koncentrací TG a rychlostí šíření pulzní vlny (PWV) a mezi postprandiální koncentrací TG měřenou 4 hodiny po podání tukové zátěže a PWV. Srovnatelné výsledky byly získány i pro TRL-TG, TRL-C a vypočtenou hodnotu remnantního cholesterolu (non-LDL-non-HDL-cholesterolu), které jsou spolu navzájem velmi těsně korelovány a odráží hromadění cholesterolu v lipoproteinech transportujících triacylglyceroly. Naproti tomu jsme nenalezli žádnou statisticky významnou asociaci mezi koncentrací TG (lačnou ani postprandiální) a dalšími neinvazivními klinickými vyšetřeními umožňujícími odhadnout stupeň aterosklerotického poškození – stanovení endoteliální dysfunkce (RHI) a tloušťky intimy-medie karotid (IMT).

Naše nálezy potvrdily, v souladu s publikovanými výsledky, že PWV je významně asociována se systolickým krevním tlakem a věkem (Cecelja & Chowienczyk, 2009). V naší studii predikci PWV výrazně zlepšilo zařazení lačných TG nebo dalších parametrů asociovaných s hladinou TG nalačno (TRL-TG, TRL-C, vypočtený RChol). To je poněkud překvapivé neboť ve výše citované systematické review byl analogický vztah prokázán pouze v jedné z 38 studií, které si tuto otázku položily. Není vyloučeno, že pozorovaná asociace souvisí se skutečností, že hladina TG představuje významnější rizikový faktor u žen než u mužů (Castelli *et al.*, 1992) a že kardiovaskulární riziko je u postmenopauzálních žen výrazně zvýšeno oproti ženám mladším. Nicméně pro patofyziologický mechanismus spojující PWV a koncentraci TG nemáme vysvětlení.

V poslední době je v oblasti výzkumu metabolického syndromu věnována značná pozornost jednoduchému parametru označovanému jako hypertriglyceridemický pas (EWET: obvod pasu u žen vyšší nebo roven než 88 cm a lačná koncentrace TG větší nebo rovna 1,45 mmol/l). Pokud byl náš soubor rozdělen podle tohoto jednoduchého kritéria, zjistili jsme významně zvýšenou IMT a Belcaro skóre - dvou parametrů, které odráží aterosklerotické poškození karotid - u skupiny s pozitivním EWET. Zdá se tedy, že tento velmi jednoduchý a snadno zjistitelný indikátor skutečně může být velmi vhodný pro odhad aterosklerotického poškození v klinické praxi.



Výsledky této studie ukázaly, že testování postprandiální lipémie v klinické praxi naráží na několik problémů. Z hlediska hodnocení kardiovaskulárního rizika by mohla být problematická i doba trvání testu. Klasické studie postprandiální lipémie totiž ukazují rozdíly v postprandiální triglyceridémii mezi pacienty a zdravými osobami až po 6 a více hodinách (Patsch *et al.*, 1992). Naše výsledky ukázaly, že vyšší prediktivní hodnotu než postprandiální triglyceridémie stanovená po 4 hodinách (Kolovou *et al.*, 2011) vykazuje koncentrace TG měřená nalačno.

V naší studii na relativně velkém a kompaktním souboru postmenopauzálních žen z běžné populace jsme nenalezli takovou asociaci, mezi koncentrací postprandiálních TG a neinvazivně hodnocenými parametry aterosklerotického a cévního poškození, která by umožňovala zařazení testu postprandiální lipémie do běžné klinické praxe. Nicméně, naše výsledky ukázaly, že triglyceridémie stanovená nalačno může významně přispět k odhadu rizika KVO u postmenopauzálních žen. U skupiny žen s pozitivním EWET jsme zjistili významně zvýšenou IMT a hodnotu Belcaro skóre - dvou parametrů, které odráží aterosklerotické poškození karotid. Zdá se tedy, že tento velmi jednoduchý a snadno zjištělný indikátor skutečně může být velmi vhodný pro odhad aterosklerotického poškození v klinické praxi.

## 6. Závěr

- A) Ve studii u zdravých dobrovolníků jsme zjistili, že přídavek 25 g glukózy k tukové zátěži (75 g tuku) nemá vliv na průběh postprandiální triglyceridémie, stimuluje však rychlejší vstup chylomikronů do cirkulace. Přídavek glukózy ale významně tlumí sekreci GLP-1 v časně postprandiální fázi do cirkulace.
- B) Prokázali jsme, že postprandiální lipémie je zvýšená u nositelů variant -1131C a 56G v genu *APOA5* asociovaných se zvýšenou hladinou TG po tukové zátěži a že tento efekt je rovněž modulován podáním glukózy.
- C) Neproklázali jsme významnou asociaci mezi koncentrací postprandiálních TG a neinvazivně hodnocenými parametry aterosklerotického poškození, která by oprávnila zařazení testu postprandiální lipémie do běžné klinické praxe.
- D) U skupiny žen s pozitivním EWET (hypertriglyceridemický pas) jsme zjistili významně zvýšenou tloušťku intimy-medie a hodnotu Belcaro skóre - dvou parametrů, které odráží aterosklerotické poškození karotid. Zdá se tedy, že tento velmi jednoduchý a snadno zjistitelný indikátor skutečně může být velmi vhodný pro odhad aterosklerotického poškození v klinické praxi.

## 7. Seznam obrázků

Obr. 1: Metabolismus lipoproteinů exogenního původu. ....	3
Obr. 2: Syntéza a sekrece lipoproteinů obsahující apoB-100. ....	4
Obr. 3: Metabolismus lipoproteinů endogenního původu. ....	5
Obr. 4: Metabolismus triacylglycerolů při lačnění. ....	7
Obr. 5: Metabolismus triacylglycerolů po jídle. ....	9
Obr. 6: Změny v hladině triacylglycerolů po jídle. ....	10
Obr. 7: Interakce TRL a LPL v cirkulaci. ....	11
Obr. 8: Závislost triglyceridémie na množství konzumovaného alkoholu. ....	14
Obr. 9: Schéma genu <i>APOA5</i> (A) a jeho haplotypů (B). ....	17
Obr. 10: Vztah hladiny TG k jednotlivým kardiovaskulárním událostem. ....	22
Obr. 11: Koncentrace glukózy. ....	33
Obr. 12: Koncentrace inzulínu. ....	34
Obr. 13: Koncentrace celkového GLP-1. ....	35
Obr. 14: Koncentrace aktivního GLP-1. ....	35
Obr. 15: Koncentrace triacylglycerolů (TG). ....	36
Obr. 16: Koncentrace TRL-TG. ....	37
Obr. 17: Koncentrace cholesterolu v TRL. ....	38
Obr. 18: Koncentrace apoB-48 v plazmě. ....	39
Obr. 19: Koncentrace apoB-48 ve frakci TRL. ....	39
Obr. 20: Koncentrace apoB-100 v TRL částicích. ....	40
Obr. 21: Koncentrace NEMK. ....	40
Obr. 22: Koncentrace cholesterolu. ....	41
Obr. 23: Koncentrace HDL-cholesterolu. ....	41
Obr. 24: Koncentrace LDL cholesterolu. ....	42
Obr. 25: Model sekrece inkretinů z enteroendokrinních buněk. ....	44
Obr. 26: Koncentrace glukózy, inzulínu a NEMK u HT a WT. ....	54
Obr. 27: Koncentrace celkového a aktivního GLP-1 u HT a WT. ....	55
Obr. 28: Koncentrace TG, TRL-TG a TRL-C u HT a WT. ....	58
Obr. 29: Model zobrazující cestu jaterních triacylglycerolů (TG). ....	62
Obr. 30: Distribuce hodnot RHI. ....	72
Obr. 31: Distribuce hodnot PWV. ....	72
Obr. 32: Korelace tloušťky pravé a levé karotidy. ....	73
Obr. 33: Distribuce kalciového skóre. ....	74
Obr. 34: Korelace mezi PWV a mezi lačnou koncentrací TG (TG 0h). ....	76
Obr. 35: Korelace mezi PWV a postprandiální koncentrací TG (TG 4h). ....	76

## 8. Seznam tabulek

Tab. 1: Přehled hlavních tříd lipoproteinů. ....	1
Tab. 2: Základní charakteristika dobrovolníků. ....	32
Tab. 3: Dvouhodinová plocha pod křivkou (AUC) a přírůstková plocha pod křivkou (AUC) pro vybrané parametry během postprandiální lipémie. ....	36
Tab. 4: Plocha pod křivkou (AUC) a přírůstková plocha pod křivkou (AUC) pro vybrané parametry během postprandiální lipémie. ....	42
Tab. 5: Koncentrace LPL v poheparinové plazmě. ....	43
Tab. 6: Sekvence primerů použitých při <i>APOA5</i> genotypizaci. ....	51
Tab. 7: Teplotní profil PCR reakce. ....	51
Tab. 8: Charakteristika dobrovolníků podle genotypu. ....	53
Tab. 9: Dvouhodinová plocha pod křivkou (2h AUC) a dvouhodinová přírůstková plocha pod křivkou (2h AUIC) pro vybrané parametry. ....	56
Tab. 10: Plocha pod křivkou (AUC) a přírůstková plocha pod křivkou (AUC) pro vybrané parametry během postprandiální lipémie. ....	59
Tab. 11: Koncentrace lipoproteinové lipázy (LPL) v poheparinové plazmě. ....	59
Tab. 12: Vyhodnocení parametru RHI. ....	68
Tab. 13: Klasifikace preklinické aterosklerózy dle Belcara, tzv. Belcaro skóre .....	69
Tab. 14: Referenční hodnoty pro Agatstonovo kalciové skóre .....	69
Tab. 15: Základní charakteristika souboru sledovaných žen. ....	70
Tab. 16: Změna parametrů 4 hodiny po podání tukové zátěže. ....	71
Tab. 17: Výsledky vyšetření tloušťky intimy-medie. ....	73
Tab. 18: Hodnocení Belcaro skóre. ....	73
Tab. 19: Korelace výsledků klinických neinvazivních vyšetření se sledovanými parametry. ....	75
Tab. 20: Regresní funkce pro rychlost pulzní vlny (PWV) - základní model. ....	77
Tab. 21: Staticky významné regresory pro rychlost pulzní vlny (PWV) - základní model .....	77
Tab. 22: Příspěvek analyzovaných proměnných k základnímu regresnímu modelu. ....	78
Tab. 23: Porovnání skupin postmenopauzálních žen podle hodnoty lačné koncentrace TG. ....	79
Tab. 24: Porovnání skupin postmenopauzálních žen podle hodnoty postprandiální koncentrace TG. ....	80
Tab. 25: Porovnání skupin postmenopauzálních žen podle EWET indikátoru. ....	81

## 9. Seznam literature

Adiels M, Mardinoglu A, Taskinen MR, Boren J (2015). Kinetic Studies to Elucidate Impaired Metabolism of Triglyceride-rich Lipoproteins in Humans. *Front Physiol* **6**(342).

Adiels M, Olofsson SO, Taskinen MR, Boren J (2008). Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**(7): 1225-1236.

Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M, Jr., Detrano R (1990). Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol* **15**(4): 827-832.

Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, *et al.* (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* **120**(16): 1640-1645.

Axtell AL, Gomari FA, Cooke JP (2010). Assessing endothelial vasodilator function with the Endo-PAT 2000. *J Vis Exp* **15**(44).

Baggio LL, Drucker DJ (2007). Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* **132**(6): 2131-2157.

Bansal S, Buring JE, Rifai N, Mora S, Sacks FM, Ridker PM (2007). Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *Jama* **298**(3): 309-316.

Bauer M, Caviezel S, Teynor A, Erbel R, Mahabadi AA, Schmidt-Trucksass A (2012). Carotid intima-media thickness as a biomarker of subclinical atherosclerosis. *Swiss Med Wkly* **25**(142): 13705.

Belcaro G, Barsotti A, Nicolaides AN (1991). "Ultrasonic biopsy"--a non-invasive screening technique to evaluate the cardiovascular risk and to follow up the progression and the regression of arteriosclerosis. *Vasa* **20**(1): 40-50.

Belcaro G, Nicolaides AN, Laurora G, Cesarone MR, De Sanctis M, Incandela L, *et al.* (1996). Ultrasound morphology classification of the arterial wall and cardiovascular events in a 6-year follow-up study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**(7): 851-856.

- Bergman EN, Havel RJ, Wolfe BM, Bohmer T (1971). Quantitative studies of the metabolism of chylomicron triglycerides and cholesterol by liver and extrahepatic tissues of sheep and dogs. *J Clin Invest* **50**(9): 1831-1839.
- Blanc V, Davidson NO (2010). APOBEC-1-mediated RNA editing. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **2**(5): 594-602.
- Boron WF, Boulpaep EL (2012). *Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach*. Updated second edn. Saunders Elsevier: Philadelphia.
- Bots ML, de Jong PT, Hofman A, Grobbee DE (1997). Left, right, near or far wall common carotid intima-media thickness measurements: associations with cardiovascular disease and lower extremity arterial atherosclerosis. *J Clin Epidemiol* **50**(7): 801-807.
- Braun JE, Severson DL (1992). Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem J* **287**(Pt 2): 337-347.
- Brien SE, Ronksley PE, Turner BJ, Mukamal KJ, Ghali WA (2011). Effect of alcohol consumption on biological markers associated with risk of coronary heart disease: systematic review and meta-analysis of interventional studies. *Bmj* **22**(342).
- Budoff MJ, Shaw LJ, Liu ST, Weinstein SR, Mosler TP, Tseng PH, *et al.* (2007). Long-term prognosis associated with coronary calcification: observations from a registry of 25,253 patients. *J Am Coll Cardiol* **49**(18): 1860-1870.
- Carpentier AC, Frisch F, Labbe SM, Gagnon R, de Wal J, Greentree S, *et al.* (2012). Effect of alipogene tiparvovec (AAV1-LPL(S447X)) on postprandial chylomicron metabolism in lipoprotein lipase-deficient patients. *J Clin Endocrinol Metab* **97**(5): 1635-1644.
- Carr RD, Larsen MO, Winzell MS, Jelic K, Lindgren O, Deacon CF, *et al.* (2008). Incretin and islet hormonal responses to fat and protein ingestion in healthy men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**(4): 8.
- Castelli WP, Anderson K, Wilson PW, Levy D (1992). Lipids and risk of coronary heart disease. The Framingham Study. *Ann Epidemiol* **2**(1-2): 23-28.
- Castro Cabezas M, Halkes CJ, Meijssen S, van Oostrom AJ, Erkelens DW (2001). Diurnal triglyceride profiles: a novel approach to study triglyceride changes. *Atherosclerosis* **155**(1): 219-228.

- 
- Catapano AL, Graham I, De Backer G, Wiklund O, Chapman MJ, Drexel H, *et al.* (2016). 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias. *Eur Heart J* **37**(39): 2999-3058.
- Cecelja M, Chowienczyk P (2009). Dissociation of aortic pulse wave velocity with risk factors for cardiovascular disease other than hypertension: a systematic review. *Hypertension* **54**(6): 1328-1336.
- Cladaras C, Hadzopoulou-Cladaras M, Nolte RT, Atkinson D, Zannis VI (1986). The complete sequence and structural analysis of human apolipoprotein B-100: relationship between apoB-100 and apoB-48 forms. *Embo J* **5**(13): 3495-3507.
- Cohen JC, Berger GM (1990). Effects of glucose ingestion on postprandial lipemia and triglyceride clearance in humans. *J Lipid Res* **31**(4): 597-602.
- Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH (2011). Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* **332**(6037): 1519-1523.
- Cohn JS, McNamara JR, Cohn SD, Ordovas JM, Schaefer EJ (1988). Postprandial plasma lipoprotein changes in human subjects of different ages. *J Lipid Res* **29**(4): 469-479.
- Dallinga-Thie GM, Franssen R, Mooij HL, Visser ME, Hassing HC, Peelman F, *et al.* (2010). The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight. *Atherosclerosis* **211**(1): 1-8.
- Davies BS, Beigneux AP, Fong LG, Young SG (2012). New wrinkles in lipoprotein lipase biology. *Curr Opin Lipidol* **23**(1): 35-42.
- Davignon J, Gregg RE, Sing CF (1988). Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* **8**(1): 1-21.
- Detrano R, Guerci AD, Carr JJ, Bild DE, Burke G, Folsom AR, *et al.* (2008). Coronary calcium as a predictor of coronary events in four racial or ethnic groups. *N Engl J Med* **358**(13): 1336-1345.
- Drucker DJ (2006). The biology of incretin hormones. *Cell Metab* **3**(3): 153-165.
- Erbel R, Mohlenkamp S, Moebus S, Schmermund A, Lehmann N, Stang A, *et al.* (2010). Coronary risk stratification, discrimination, and reclassification improvement based on quantification of subclinical coronary atherosclerosis: the Heinz Nixdorf Recall study. *J Am Coll Cardiol* **56**(17): 1397-1406.

- Ezcurra M, Reimann F, Gribble FM, Emery E (2013). Molecular mechanisms of incretin hormone secretion. *Curr Opin Pharmacol* **13**(6): 922-927.
- Farese RV, Jr., Yost TJ, Eckel RH (1991). Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase activity by insulin/glucose in normal-weight humans. *Metabolism* **40**(2): 214-216.
- Fielding BA, Callow J, Owen RM, Samra JS, Matthews DR, Frayn KN (1996). Postprandial lipemia: the origin of an early peak studied by specific dietary fatty acid intake during sequential meals. *Am J Clin Nutr* **63**(1): 36-41.
- Fielding BA, Reid G, Grady M, Humphreys SM, Evans K, Frayn KN (2000). Ethanol with a mixed meal increases postprandial triacylglycerol but decreases postprandial non-esterified fatty acid concentrations. *Br J Nutr* **83**(6): 597-604.
- Filipovsky J, Svobodova V, Pecen L (2000). Reproducibility of radial pulse wave analysis in healthy subjects. *J Hypertens* **18**(8): 1033-1040.
- Forte TM, Shu X, Ryan RO (2009). The ins (cell) and outs (plasma) of apolipoprotein A-V. *J Lipid Res* **50**(5): 2.
- Frayn KN (2002). Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia* **45**(9): 1201-1210.
- Frayn KN, Arner P, Yki-Jarvinen H (2006). Fatty acid metabolism in adipose tissue, muscle and liver in health and disease. *Essays Biochem* **42**: 89-103.
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* **18**(6): 499-502.
- Fruchart-Najib J, Bauge E, Niculescu LS, Pham T, Thomas B, Rommens C, *et al.* (2004). Mechanism of triglyceride lowering in mice expressing human apolipoprotein A5. *Biochem Biophys Res Commun* **319**(2): 397-404.
- Gao X, Forte TM, Ryan RO (2012). Influence of apolipoprotein A-V on hepatocyte lipid droplet formation. *Biochem Biophys Res Commun* **427**(2): 361-365.
- Gill JM, Mees GP, Frayn KN, Hardman AE (2001). Moderate exercise, postprandial lipaemia and triacylglycerol clearance. *Eur J Clin Invest* **31**(3): 201-207.
- Glickman RM, Rogers M, Glickman JN (1986). Apolipoprotein B synthesis by human liver and intestine in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(14): 5296-5300.



- Goldberg IJ (1996). Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Lipid Res* **37**(4): 693-707.
- Goldberg IJ, Eckel RH, Abumrad NA (2009). Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. *J Lipid Res* **50**(90): 24.
- Gotto AM, Jr., Pownall HJ (2003). *Manual of Lipid Disorders. Reducing the risk for Coronary Heart Disease*. Third edn. Lippincot Williams & Wilkins: Philadelphia.
- Groot PH, van Stiphout WA, Krauss XH, Jansen H, van Tol A, van Ramshorst E, *et al.* (1991). Postprandial lipoprotein metabolism in normolipidemic men with and without coronary artery disease. *Arterioscler Thromb* **11**(3): 653-662.
- Haffner SM, Miettinen H, Stern MP (1997). The homeostasis model in the San Antonio Heart Study. *Diabetes Care* **20**(7): 1087-1092.
- Hahne P, Krempler F, Schaap FG, Soyal SM, Hoffinger H, Miller K, *et al.* (2008). Determinants of plasma apolipoprotein A-V and APOA5 gene transcripts in humans. *J Intern Med* **264**(5): 452-462.
- Hamsten A, Silveira A, Boquist S, Tang R, Bond MG, de Faire U, *et al.* (2005). The apolipoprotein CI content of triglyceride-rich lipoproteins independently predicts early atherosclerosis in healthy middle-aged men. *J Am Coll Cardiol* **45**(7): 1013-1017.
- Harbis A, Defoort C, Narbonne H, Juhel C, Senft M, Latge C, *et al.* (2001). Acute hyperinsulinism modulates plasma apolipoprotein B-48 triglyceride-rich lipoproteins in healthy subjects during the postprandial period. *Diabetes* **50**(2): 462-469.
- Hardman AE (1998). The influence of exercise on postprandial triacylglycerol metabolism. *Atherosclerosis* **141**(1): S93-100.
- Harris WS, Connor WE, Alam N, Illingworth DR (1988). Reduction of postprandial triglyceridemia in humans by dietary n-3 fatty acids. *J Lipid Res* **29**(11): 1451-1460.
- Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH (1955). The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* **34**(9): 1345-1353.
- Hein GJ, Baker C, Hsieh J, Farr S, Adeli K (2013). GLP-1 and GLP-2 as yin and yang of intestinal lipoprotein production: evidence for predominance of GLP-2-stimulated postprandial lipemia in normal and insulin-resistant states. *Diabetes* **62**(2): 373-381.

- Henneman P, Schaap FG, Havekes LM, Rensen PC, Frants RR, van Tol A, *et al.* (2007). Plasma apoAIV levels are markedly elevated in severe hypertriglyceridemia and positively correlated with the APOA5 S19W polymorphism. *Atherosclerosis* **193**(1): 129-134.
- Herrmann C, Goke R, Richter G, Fehmann HC, Arnold R, Goke B (1995). Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion* **56**(2): 117-126.
- Hokanson JE, Austin MA (1996). Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk* **3**(2): 213-219.
- Holst JJ (2007). The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev* **87**(4): 1409-1439.
- Holst JJ, Gromada J (2004). Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **287**(2): E199-206.
- Holz GG (2004). New insights concerning the glucose-dependent insulin secretagogue action of glucagon-like peptide-1 in pancreatic beta-cells. *Horm Metab Res* **36**(11-12): 787-794.
- Hubacek JA, Skodova Z, Adamkova V, Lanska V, Poledne R (2004). The influence of APOAIV polymorphisms (T-1131>C and S19>W) on plasma triglyceride levels and risk of myocardial infarction. *Clin Genet* **65**(2): 126-130.
- Chong MF, Fielding BA, Frayn KN (2007). Mechanisms for the acute effect of fructose on postprandial lipemia. *Am J Clin Nutr* **85**(6): 1511-1520.
- Irvin MR, Kabagambe EK, Tiwari HK, Parnell LD, Straka RJ, Tsai M, *et al.* (2010). Apolipoprotein E polymorphisms and postprandial triglyceridemia before and after fenofibrate treatment in the Genetics of Lipid Lowering and Diet Network (GOLDN) Study. *Circ Cardiovasc Genet* **3**(5): 462-467.
- Ishihara M, Kujiraoka T, Iwasaki T, Nagano M, Takano M, Ishii J, *et al.* (2005). A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for human plasma apolipoprotein A-IV concentration. *J Lipid Res* **46**(9): 2015-2022.
- Jang Y, Kim JY, Kim OY, Lee JE, Cho H, Ordovas JM, *et al.* (2004). The -1131T-->C polymorphism in the apolipoprotein A5 gene is associated with postprandial hypertriacylglycerolemia; elevated small, dense LDL concentrations; and oxidative stress in nonobese Korean men. *Am J Clin Nutr* **80**(4): 832-840.

- Karpe F, Bell M, Bjorkegren J, Hamsten A (1995). Quantification of postprandial triglyceride-rich lipoproteins in healthy men by retinyl ester labeling and simultaneous measurement of apolipoproteins B-48 and B-100. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**(2): 199-207.
- Karpe F, de Faire U, Mercuri M, Bond MG, Hellenius ML, Hamsten A (1998). Magnitude of alimentary lipemia is related to intima-media thickness of the common carotid artery in middle-aged men. *Atherosclerosis* **141**(2): 307-314.
- Karpe F, Hamsten A (1994). Determination of apolipoproteins B-48 and B-100 in triglyceride-rich lipoproteins by analytical SDS-PAGE. *J Lipid Res* **35**(7): 1311-1317.
- Karpe F, Steiner G, Olivecrona T, Carlson LA, Hamsten A (1993). Metabolism of triglyceride-rich lipoproteins during alimentary lipemia. *J Clin Invest* **91**(3): 748-758.
- Kei AA, Filippatos TD, Tsimihodimos V, Elisaf MS (2012). A review of the role of apolipoprotein C-II in lipoprotein metabolism and cardiovascular disease. *Metabolism* **61**(7): 906-921.
- Kersten S (2014). Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta* **7**: 919-933.
- Kikuchi K, Nezu U, Inazumi K, Miyazaki T, Ono K, Orime K, *et al.* (2012). Double-blind randomized clinical trial of the effects of ezetimibe on postprandial hyperlipidaemia and hyperglycaemia. *J Atheroscler Thromb* **19**(12): 1093-1101.
- Kim JY, Kim OY, Paik JK, Lee SH, Lee JH (2013). Association of apolipoprotein A-V concentration with apolipoprotein A5 gene -1131T>C polymorphism and fasting triglyceride levels. *J Clin Lipidol* **7**(2): 94-101.
- Kolovou GD, Anagnostopoulou KK, Salpea KD, Daskalopoulou SS, Mikhailidis DP (2007). The effect of statins on postprandial lipemia. *Curr Drug Targets* **8**(4): 551-560.
- Kolovou GD, Kostakou PM, Anagnostopoulou KK, Cokkinos DV (2008). Therapeutic effects of fibrates in postprandial lipemia. *Am J Cardiovasc Drugs* **8**(4): 243-255.
- Kolovou GD, Mikhailidis DP, Kovar J, Lairon D, Nordestgaard BG, Ooi TC, *et al.* (2011). Assessment and clinical relevance of non-fasting and postprandial triglycerides: an expert panel statement. *Curr Vasc Pharmacol* **9**(3): 258-270.
- Kotite L, Bergeron N, Havel RJ (1995). Quantification of apolipoproteins B-100, B-48, and E in human triglyceride-rich lipoproteins. *J Lipid Res* **36**(4): 890-900.

- Krasinski SD, Cohn JS, Russell RM, Schaefer EJ (1990a). Postprandial plasma vitamin A metabolism in humans: a reassessment of the use of plasma retinyl esters as markers for intestinally derived chylomicrons and their remnants. *Metabolism* **39**(4): 357-365.
- Krasinski SD, Cohn JS, Schaefer EJ, Russell RM (1990b). Postprandial plasma retinyl ester response is greater in older subjects compared with younger subjects. Evidence for delayed plasma clearance of intestinal lipoproteins. *J Clin Invest* **85**(3): 883-892.
- Lairon D, Defoort C (2011). Effects of nutrients on postprandial lipemia. *Curr Vasc Pharmacol* **9**(3): 309-312.
- Lairon D, Lopez-Miranda J, Williams C (2007). Methodology for studying postprandial lipid metabolism. *Eur J Clin Nutr* **61**(10): 1145-1161.
- Lewis GF (1997). Fatty acid regulation of very low density lipoprotein production. *Curr Opin Lipidol* **8**(3): 146-153.
- Lewis GF, Uffelman KD, Szeto LW, Steiner G (1993). Effects of acute hyperinsulinemia on VLDL triglyceride and VLDL apoB production in normal weight and obese individuals. *Diabetes* **42**(6): 833-842.
- Lieberman M, Marks AD, Peet A (2013). *Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach*. Fourth edn. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business.
- Liu J, Afroza H, Rader DJ, Jin W (2010). Angiopoietin-like protein 3 inhibits lipoprotein lipase activity through enhancing its cleavage by proprotein convertases. *J Biol Chem* **285**(36): 27561-27570.
- Lopez-Miranda J, Williams C, Lairon D (2007). Dietary, physiological, genetic and pathological influences on postprandial lipid metabolism. *Br J Nutr* **98**(3): 458-473.
- Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Jr., Weisgraber KH (1984). Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res* **25**(12): 1277-1294.
- Martin S, Nicaud V, Humphries SE, Talmud PJ (2003). Contribution of APOA5 gene variants to plasma triglyceride determination and to the response to both fat and glucose tolerance challenges. *Biochim Biophys Acta* **17**(3): 217-225.
- Marz W, Siekmeier R, Scharnagl H, Seiffert UB, Gross W (1993). Fast lipoprotein chromatography: new method of analysis for plasma lipoproteins. *Clin Chem* **39**(11 Pt 1): 2276-2281.

- Masana L, Ribalta J, Salazar J, Fernandez-Ballart J, Joven J, Cabezas MC (2003). The apolipoprotein AV gene and diurnal triglyceridaemia in normolipidaemic subjects. *Clin Chem Lab Med* **41**(4): 517-521.
- Mattijssen F, Kersten S (2012). Regulation of triglyceride metabolism by Angiopoietin-like proteins. *Biochim Biophys Acta* **5**: 782-789.
- Mead JR, Irvine SA, Ramji DP (2002). Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med* **80**(12): 753-769.
- Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ (2002). Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res* **43**(12): 1997-2006.
- Merkel M, Heeren J (2005a). Give me A5 for lipoprotein hydrolysis! *J Clin Invest* **115**(10): 2694-2696.
- Merkel M, Loeffler B, Kluger M, Fabig N, Geppert G, Pennacchio LA, *et al.* (2005b). Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *J Biol Chem* **280**(22): 21553-21560.
- Meyer E, Westerveld HT, de Ruyter-Meijstek FC, van Greevenbroek MM, Rienks R, van Rijn HJ, *et al.* (1996). Abnormal postprandial apolipoprotein B-48 and triglyceride responses in normolipidemic women with greater than 70% stenotic coronary artery disease: a case-control study. *Atherosclerosis* **124**(2): 221-235.
- Miesenbock G, Holzl B, Foger B, Brandstatter E, Paulweber B, Sandhofer F, *et al.* (1993). Heterozygous lipoprotein lipase deficiency due to a missense mutation as the cause of impaired triglyceride tolerance with multiple lipoprotein abnormalities. *J Clin Invest* **91**(2): 448-455.
- Mihas C, Kolovou GD, Mikhailidis DP, Kovar J, Lairon D, Nordestgaard BG, *et al.* (2011). Diagnostic value of postprandial triglyceride testing in healthy subjects: a meta-analysis. *Curr Vasc Pharmacol* **9**(3): 271-280.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **16**(3).
- Mora S, Rifai N, Buring JE, Ridker PM (2008). Fasting compared with nonfasting lipids and apolipoproteins for predicting incident cardiovascular events. *Circulation* **118**(10): 993-1001.

- Moreno R, Perez-Jimenez F, Marin C, Moreno JA, Gomez P, Bellido C, *et al.* (2006). A single nucleotide polymorphism of the apolipoprotein A-V gene -1131T>C modulates postprandial lipoprotein metabolism. *Atherosclerosis* **189**(1): 163-168.
- Mudrakova E, Poledne R, Kovar J (2013). Postprandial triglyceridemia after single dose of alcohol in healthy young men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **23**(3): 183-188.
- Nakamura K, Miyoshi T, Yunoki K, Ito H (2016). Postprandial hyperlipidemia as a potential residual risk factor. *J Cardiol* **67**(4): 335-339.
- Newsholme P, Cruzat V, Arfuso F, Keane K (2014). Nutrient regulation of insulin secretion and action. *J Endocrinol* **221**(3): 13-0616.
- Nikkila EA, Taskinen MR, Huttunen JK (1978). Effect of acute ethanol load on postheparin plasma lipoprotein lipase and hepatic lipase activities and intravenous fat tolerance. *Horm Metab Res* **10**(3): 220-223.
- Nilsson-Ehle P, Carlstrom S, Belfrage P (1975). Rapid effect on lipoprotein lipase activity in adipose tissue of humans after carbohydrate and lipid intake. *Scand J Clin Lab Invest* **35**(4): 373-378.
- Nilsson M, Stenberg M, Frid AH, Holst JJ, Bjorck IM (2004). Glycemia and insulinemia in healthy subjects after lactose-equivalent meals of milk and other food proteins: the role of plasma amino acids and incretins. *Am J Clin Nutr* **80**(5): 1246-1253.
- Nishiwaki M, Ishikawa T, Ito T, Shige H, Tomiyasu K, Nakajima K, *et al.* (1994). Effects of alcohol on lipoprotein lipase, hepatic lipase, cholesteryl ester transfer protein, and lecithin:cholesterol acyltransferase in high-density lipoprotein cholesterol elevation. *Atherosclerosis* **111**(1): 99-109.
- Nolan CJ, Madiraju MS, Delghingaro-Augusto V, Peyot ML, Prentki M (2006). Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion. *Diabetes* **55**(2): S16-23.
- Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A (2007). Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *Jama* **298**(3): 299-308.
- Nordestgaard BG, Freiberg JJ (2011). Clinical relevance of non-fasting and postprandial hypertriglyceridemia and remnant cholesterol. *Curr Vasc Pharmacol* **9**(3): 281-286.

- Nowak M, Helleboid-Chapman A, Jakel H, Martin G, Duran-Sandoval D, Staels B, *et al.* (2005). Insulin-mediated down-regulation of apolipoprotein A5 gene expression through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role of upstream stimulatory factor. *Mol Cell Biol* **25**(4): 1537-1548.
- Nowak M, Helleboid-Chapman A, Jakel H, Moitrot E, Rommens C, Pennacchio LA, *et al.* (2008). Glucose regulates the expression of the apolipoprotein A5 gene. *J Mol Biol* **380**(5): 789-798.
- O'Brien PJ, Alborn WE, Sloan JH, Ulmer M, Boodhoo A, Knierman MD, *et al.* (2005). The novel apolipoprotein A5 is present in human serum, is associated with VLDL, HDL, and chylomicrons, and circulates at very low concentrations compared with other apolipoproteins. *Clin Chem* **51**(2): 351-359.
- O'Rourke RA, Brundage BH, Froelicher VF, Greenland P, Grundy SM, Hachamovitch R, *et al.* (2000). American College of Cardiology/American Heart Association Expert Consensus document on electron-beam computed tomography for the diagnosis and prognosis of coronary artery disease. *Circulation* **102**(1): 126-140.
- Okazaki M, Itakura H, Shiraishi K, Hara I (1983). Serum lipoprotein measurement--liquid chromatography and sequential floatation (ultracentrifugation) compared. *Clin Chem* **29**(5): 768-773.
- Olivecrona G, Olivecrona T (1995). Triglyceride lipases and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **6**(5): 291-305.
- Olofsson SO, Boren J (2005). Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis. *J Intern Med* **258**(5): 395-410.
- Ooi TC, Robinson L, Graham T, Kolovou GD, Mikhailidis DP, Lairon D (2011). Proposing a "lipemic index" as a nutritional and research tool. *Curr Vasc Pharmacol* **9**(3): 313-317.
- Ostman EM, Liljeberg Elmstahl HG, Bjorck IM (2001). Inconsistency between glycemic and insulinemic responses to regular and fermented milk products. *Am J Clin Nutr* **74**(1): 96-100.
- Palmen J, Smith AJ, Dorfmeister B, Putt W, Humphries SE, Talmud PJ (2008). The functional interaction on in vitro gene expression of APOA5 SNPs, defining haplotype APOA52, and their paradoxical association with plasma triglyceride but not plasma apoAV levels. *Biochim Biophys Acta*: 18.

- Patsch JR, Miesenbock G, Hopferwieser T, Muhlberger V, Knapp E, Dunn JK, *et al.* (1992). Relation of triglyceride metabolism and coronary artery disease. Studies in the postprandial state. *Arterioscler Thromb* **12**(11): 1336-1345.
- Patsch JR, Prasad S, Gotto AM, Jr., Bengtsson-Olivecrona G (1984). Postprandial lipemia. A key for the conversion of high density lipoprotein2 into high density lipoprotein3 by hepatic lipase. *J Clin Invest* **74**(6): 2017-2023.
- Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC, *et al.* (2001). An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science* **294**(5540): 169-173.
- Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Krauss RM, Rubin EM, Cohen JC (2002). Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence human plasma triglyceride levels. *Hum Mol Genet* **11**(24): 3031-3038.
- Pitřha J (2007). Detekce preklinické aterosklerózy. *Interni medicina pro praxi* **9**(4): 175-177.
- Pitha J, Lesna K, Sekerkova A, Poledne R, Kovar J, Lejskova M, *et al.* (2013). Menopausal transition enhances the atherogenic risk of smoking in middle aged women. *Int J Cardiol* **168**(1): 190-196.
- Rader DJ (2006). Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *J Clin Invest* **116**(12): 3090-3100.
- Rapp JH, Lespine A, Hamilton RL, Colyvas N, Chaumeton AH, Tweedie-Hardman J, *et al.* (1994). Triglyceride-rich lipoproteins isolated by selected-affinity anti-apolipoprotein B immunosorption from human atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb* **14**(11): 1767-1774.
- Riley WA (2004). Cardiovascular risk assessment in individual patients from carotid intimal-medial thickness measurements. *Curr Atheroscler Rep* **6**(3): 225-231.
- Robertson MD, Parkes M, Warren BF, Ferguson DJ, Jackson KG, Jewell DP, *et al.* (2003). Mobilisation of enterocyte fat stores by oral glucose in humans. *Gut* **52**(6): 834-839.
- Rubinshtein R, Kuvin JT, Soffler M, Lennon RJ, Lavi S, Nelson RE, *et al.* (2010). Assessment of endothelial function by non-invasive peripheral arterial tonometry predicts late cardiovascular adverse events. *Eur Heart J* **31**(9): 1142-1148.



- Ruotolo G, Zhang H, Bentsianov V, Le NA (1992). Protocol for the study of the metabolism of retinyl esters in plasma lipoproteins during postprandial lipemia. *J Lipid Res* **33**(10): 1541-1549.
- Sadur CN, Eckel RH (1982). Insulin stimulation of adipose tissue lipoprotein lipase. Use of the euglycemic clamp technique. *J Clin Invest* **69**(5): 1119-1125.
- Sharma V, Ryan RO, Forte TM (2012). Apolipoprotein A-V dependent modulation of plasma triacylglycerol: a puzzlement. *Biochim Biophys Acta* **5**: 795-799.
- Shu X, Nelbach L, Weinstein MM, Burgess BL, Beckstead JA, Young SG, *et al.* (2010). Intravenous injection of apolipoprotein A-V reconstituted high-density lipoprotein decreases hypertriglyceridemia in apoav<sup>-/-</sup> mice and requires glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**(12): 2504-2509.
- Schaap FG, Rensen PC, Voshol PJ, Vrans C, van der Vliet HN, Chamuleau RA, *et al.* (2004). ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis. *J Biol Chem* **279**(27): 27941-27947.
- Schneeman BO, Kotite L, Todd KM, Havel RJ (1993). Relationships between the responses of triglyceride-rich lipoproteins in blood plasma containing apolipoproteins B-48 and B-100 to a fat-containing meal in normolipidemic humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(5): 2069-2073.
- Schneider J, Liesenfeld A, Mordasini R, Schubotz R, Zofel P, Kubel F, *et al.* (1985). Lipoprotein fractions, lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase during short-term and long-term uptake of ethanol in healthy subjects. *Atherosclerosis* **57**(2-3): 281-291.
- Schweiger M, Schreiber R, Haemmerle G, Lass A, Fledelius C, Jacobsen P, *et al.* (2006). Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *J Biol Chem* **281**(52): 40236-40241.
- Sidhu D, Naugler C (2012). Fasting time and lipid levels in a community-based population: a cross-sectional study. *Arch Intern Med* **172**(22): 1707-1710.
- Sorensen LP, Andersen IR, Sondergaard E, Gormsen LC, Schmitz O, Christiansen JS, *et al.* (2011). Basal and insulin mediated VLDL-triglyceride kinetics in type 2 diabetic men. *Diabetes* **60**(1): 88-96.

- Sukonina V, Lookene A, Olivecrona T, Olivecrona G (2006). Angiopoietin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(46): 17450-17455.
- Talmud PJ, Palmen J, Putt W, Lins L, Humphries SE (2005). Determination of the functionality of common APOA5 polymorphisms. *J Biol Chem* **280**(31): 28215-28220.
- Tanko LB, Bagger YZ, Qin G, Alexandersen P, Larsen PJ, Christiansen C (2005). Enlarged waist combined with elevated triglycerides is a strong predictor of accelerated atherogenesis and related cardiovascular mortality in postmenopausal women. *Circulation* **111**(15): 1883-1890.
- Tikkanen MJ, Cole TG, Hahm KS, Krul ES, Schonfeld G (1984). Expression of apolipoprotein B epitopes in very low density lipoprotein subfractions. Studies with monoclonal antibodies. *Arteriosclerosis* **4**(2): 138-146.
- Tiret L, Gerdes C, Murphy MJ, Dallongeville J, Nicaud V, O'Reilly DS, *et al.* (2000). Postprandial response to a fat tolerance test in young adults with a paternal history of premature coronary heart disease - the EARS II study (European Atherosclerosis Research Study). *Eur J Clin Invest* **30**(7): 578-585.
- Tolstrup JS, Gronbaek M, Nordestgaard BG (2009). Alcohol intake, myocardial infarction, biochemical risk factors, and alcohol dehydrogenase genotypes. *Circ Cardiovasc Genet* **2**(5): 507-514.
- Torres do Rego A, Klop B, Birnie E, Elte JW, Ramos VC, Walther LA, *et al.* (2013). Diurnal triglyceridemia in relation to alcohol intake in men. *Nutrients* **5**(12): 5114-5126.
- Uiterwaal CS, Grobbee DE, Witteman JC, van Stiphout WA, Krauss XH, Havekes LM, *et al.* (1994). Postprandial triglyceride response in young adult men and familial risk for coronary atherosclerosis. *Ann Intern Med* **121**(8): 576-583.
- Van Bortel LM, Laurent S, Boutouyrie P, Chowienczyk P, Cruickshank JK, De Backer T, *et al.* (2012). Expert consensus document on the measurement of aortic stiffness in daily practice using carotid-femoral pulse wave velocity. *J Hypertens* **30**(3): 445-448.
- van der Vliet HN, Sammels MG, Leegwater AC, Levels JH, Reitsma PH, Boers W, *et al.* (2001). Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration. *J Biol Chem* **276**(48): 44512-44520.
- Vollmer K, Gardiwal H, Menge BA, Goetze O, Deacon CF, Schmidt WE, *et al.* (2009). Hyperglycemia acutely lowers the postprandial excursions of glucagon-like Peptide-1 and gastric inhibitory polypeptide in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **94**(4): 1379-1385.

- Vrablik M, Horinek A, Ceska R, Adamkova V, Poledne R, Hubacek JA (2003). Ser19-->Trp polymorphism within the apolipoprotein AV gene in hypertriglyceridaemic people. *J Med Genet* **40**(8).
- Wang J, Ban MR, Zou GY, Cao H, Lin T, Kennedy BA, *et al.* (2008). Polygenic determinants of severe hypertriglyceridemia. *Hum Mol Genet* **17**(18): 2894-2899.
- Warnick GR, Knopp RH, Fitzpatrick V, Branson L (1990). Estimating low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald equation is adequate for classifying patients on the basis of nationally recommended cutpoints. *Clin Chem* **36**(1): 15-19.
- Weinberg RB, Cook VR, Beckstead JA, Martin DD, Gallagher JW, Shelness GS, *et al.* (2003). Structure and interfacial properties of human apolipoprotein A-V. *J Biol Chem* **278**(36): 34438-34444.
- Wendler D, Michel E, Kastner P, Schmahl FW (1992). Menstrual cycle exhibits no effect on postprandial lipemia. *Horm Metab Res* **24**(12): 580-581.
- Westerink J, Deanfield JE, Imholz BP, Spiering W, Basart DC, Coll B, *et al.* (2013). High-dose statin monotherapy versus low-dose statin/ezetimibe combination on fasting and postprandial lipids and endothelial function in obese patients with the metabolic syndrome: The PANACEA study. *Atherosclerosis* **227**(1): 118-124.
- Whitfield JB, Heath AC, Madden PA, Pergadia ML, Montgomery GW, Martin NG (2013). Metabolic and biochemical effects of low-to-moderate alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res* **37**(4): 575-586.
- Xiao C, Dash S, Morgantini C, Lewis GF (2013). Novel role of enteral monosaccharides in intestinal lipoprotein production in healthy humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**(5): 1056-1062.
- Young SG, Zechner R (2013). Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. *Genes Dev* **27**(5): 459-484.
- Zemankova K, Makoveichuk E, Vlasakova Z, Olivecrona G, Kovar J (2015). Acute alcohol consumption downregulates lipoprotein lipase activity in vivo. *Metabolism* **64**(11): 1592-1596.
- Zilversmit DB (1979). Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation* **60**(3): 473-485.

## 10. Seznam publikací a prezentací

### 10.1 Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

**Zemánková K.**, Mrázková, J., Piťha, J., Kovář, J. The effect of glucose when added to a fat load on the response of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and apolipoprotein B-48 in the postprandial phase. *Physiological research*. 2015, 64(Suppl. 3), S363-S369. ISSN 0862-8408. IF 1,643 (2015).

**Zemánková, K.**, Dembovská, R., Piťha, J., Kovář, J. Glucose added to a fat load suppresses the postprandial triglyceridemia response in carriers of the -1131C and 56G variants of the *APOA5* gene. *Physiological research*. 2017, accepted. IF 1,643 (2015).

Kovář, J., **Zemánková, K.** Moderate alcohol consumption and triglyceridemia. *Physiological research*. 2015, 64(Suppl. 3), S371-S375. ISSN 0862-8408. IF 1,643 (2015).

**Zemánková, K.**, Makoveichuk, E., Vlasáková, Z., Olivecrona, G., Kovář, J. Acute alcohol consumption downregulates lipoprotein lipase activity in vivo. *Metabolism: clinical and experimental*. 2015, 64(11), 1592-1596. ISSN 0026-0495. IF 4,375 (2015).

### 10.2 Publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace

Blahová, T., Peterková, L., Leníček, M., Vlachová, M., **Zemánková, K.**, Adámková, V., Vitek, L., Kovář, J. The effect of colessevelam treatment on bile acid and lipid metabolism and glycemic control in healthy men. *Physiological research*. 2016, 65(6): 995–1003. ISSN 0862-8408. IF 1,643 (2015).

### 10.3 Prezentace na konferencích

**Zemánková, K.**, Kovář, J.: Acute alcohol consumption affects lipoprotein lipase activity in vivo. 10<sup>th</sup> International Congress on Coronary Artery Disease, Florencie, Itálie. 13. - 16. 10. 2013. **Poster.**

**Zemánková, K.** Ouředníková, L.: Postprandial lipemia testing - does fat alone affects insulinemia during early postprandial phase? 10<sup>th</sup> International Congress on Coronary Artery Disease, Florencie, Itálie. 13. - 16. 10. 2013. **Poster.**

**Zemánková, K.**, Kovář, J.: Akutní konzumace alkoholu ovlivňuje aktivitu LPL *in vivo*. 17. Kongres o ateroskleróze, Špindlerův Mlýn, Česká republika. 5. - 7. 12. 2013. **Poster.**

Fiedlerová, M., **Zemánková, K.**, Kovář, J.: Využití sekvenční ultracentrifugace lipoproteinů v klinickém výzkumu a v diagnostice. 17. Kongres o ateroskleróze, Špindlerův Mlýn, Česká republika. 5. - 7. 12. 2013. **Poster.**

Kovář, J., **Zemánková, K.**, Jindřichová, E., Poledne, R.: Alkohol a metabolismus triglyceridů v postprandiální fázi. 17. Kongres o ateroskleróze, Špindlerův Mlýn, Česká republika. 5. - 7. 12. 2013. **Přednáška.**

**Zemánková, K.**, Kovář, J.: Acute alcohol consumption affects lipoprotein lipase activity in vivo. 82<sup>nd</sup> EAS Congress, Madrid, Španělsko. 31. 5. - 3. 6. 2014. **Poster.**

Kovář, J., Ouředníková, L., **Zemánková, K.**: Postprandial lipemia testing - does fat alone affects insulinemia during early postprandial phase? 82<sup>nd</sup> EAS Congress, Madrid, Španělsko. 31. 5. - 3. 6. 2014. **Poster.**

**Zemánková, K.**, Mrázková, J., Piťha, J., Kovář, J.: Glucose addition to a fat load does not affect the postprandial response of triglyceride-rich lipoproteins. The 2<sup>nd</sup> World Congress of Clinical Lipidology, Vídeň, Rakousko. 5. - 7. 12. 2014. **Poster.**

Peterková, L., **Zemánková, K.**, Adámková, V., Kovář, J.: Effect of colessevelam treatment on parameters of insulin sensitivity. The 2<sup>nd</sup> World Congress of Clinical Lipidology, Vídeň, Rakousko. 5. - 7. 12. 2014. **Poster.**

**Zemánková K.**, Mrázková, J., Houdková, R., Piťha, J., Kovář, J.: Glucose addition to a fat load does not affect the postprandial response of triglyceride-rich lipoproteins. 18. Kongres o ateroskleróze, Špindlerův Mlýn, Česká republika. 11. - 13. 12. 2014. **Poster.**

**Zemánková, K.**, Mrázková, J., Houdková, R., Piřha, J., Kovář, J.: Glucose addition affects postprandial response of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) to a test meal. 83<sup>rd</sup> EAS Congress, Glasgow, Velká Británie. 22. - 25. 3. 2015. **Oral poster presentation with discussion.**

**Zemánková, K.**, Mrázková, J., Houdková, R., Piřha, J., Kovář, J.: Glucose addition affects postprandial response of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) to a test meal. 17<sup>th</sup> International Symposium on Atherosclerosis, Amsterdam, Nizozemsko. 23. - 26. 5. 2015. **Poster.**

Kovář, J., **Zemánková, K.**, Mrázková, J., Houdková, R., Piřha, J.: Fasting and postprandial triglyceridemia is associated with an increased arterial stiffness in postmenopausal women. 17<sup>th</sup> International Symposium on Atherosclerosis, Amsterdam, Nizozemsko. 23. - 26. 5. 2015. **Poster.**

Peterková, L., Blahová, T., Kovář, J., **Zemánková, K.**, Adámková, V.: The dynamics of lipoprotein and glucose concentration after coleslam treatment. 17<sup>th</sup> International Symposium on Atherosclerosis, Amsterdam, Nizozemsko. 23. - 26. 5. 2015. **Poster.**

**Zemánková, K.:** Regulace postprandiální lipémie. Sympozium triglyceridy a ateroskleróza, Praha, Česká republika. 23. 9. 2015. **Přednáška.**

**Zemánková K.**, Mrázková J., Houdková R., Piřha J., Kovář J.: Glucose addition affects postprandial response of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) to a test meal. RECOOP 2015 Annual Project Review, Praha, Česká republika. 15. - 18. 10. 2015. **Přednáška.**

**Zemánková K.**, Dembovská R., Kovář J.: Vliv polymorfismu v genu pro *APOA5* na průběh postprandiální lipémie. 19. Kongres o ateroskleróze, Špindlerův Mlýn, Česká republika, 3. - 5. 12. 2015. **Poster.**

Kovář J., **Zemánková K.**, Mrázková J., Houdková R., Piřha J.: Postprandiální triglyceridémie a progrese aterosklerózy hodnocená neinvazivními metodami u postmenopauzálních žen. 19. Kongres o ateroskleróze, Špindlerův Mlýn, Česká republika, 3. - 5. 12. 2015. **Přednáška.**

**Zemánková K.:** Vliv polymorfismu v genu pro *APOA5* a složení diety na rozsah postprandiální lipémie. Šobrův den, XXX. konference o hyperlipoproteinemiích, Praha, Česká republika. 8. 6. 2016. **Přednáška.**

Kovář J., Blahová T., **Zemánková K.**, Drobný M., Šedivý P., Deligianni X., Dezortová M., Hájek M.: Sledování dynamiky změn obsahu tuku v játrech po pokusné zátěži. 20. Kongres o ateroskleróze, Špindlerův Mlýn, 8. – 10. 12. 2016. **Přednáška.**

Blahová T., Drobný M., Šedivý P., Dezortová M., Deligianni X., **Zemánková K.**, Kovář J., Hájek M.: Porovnání dvou metod magnetické rezonance pro stanovení obsahu tuku v játrech. 20. Kongres o ateroskleróze, Špindlerův Mlýn, 8. – 10. 12. 2016. **Poster.**

**Zemánková K.**, Blahová T., Kovář J., Hájek M.: Metabolické změny po podání tukové zátěže. 20. Kongres o ateroskleróze, Špindlerův Mlýn, 8. – 10. 12. 2016. **Poster.**

Blahová T., **Zemánková K.**, Drobný M., Šedivý P., Deligianni X., Dezortová M., Kovář J., Hájek M.: Fasting NEFA concentration correlates with visceral fat volume determined using MR in healthy volunteers. 85<sup>th</sup> EAS Congress, Praha, Česká republika. 23. - 26. 4. 201. **Poster.**

Drobný M., Šedivý P., Blahová T., **Zemánková K.**, Dezortová M., Kovář J., Hájek M.: Effect of dietary intervention on liver fat content during the day A pilot study. 25<sup>th</sup> ISMRM Meeting, Honolulu, Havaj. 22. - 27. 4. 2017. **Poster.**

## 11. Přílohy

### 11.1 Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

#### 11.1.1 K. Zemánková *et al.*, *Physiol Res.* (2015)

Zemánková, K., Mrázková, J., Piřha, J., Kovář, J.

**The effect of glucose when added to a fat load on the response of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and apolipoprotein B-48 in the postprandial phase.**

*Physiological research.* 2015, 64(Suppl. 3), S363-S369. ISSN 0862-8408.

IF 1,643 (2015).

Příspěvek:

Příprava a provedení studie u 30 dobrovolníků, zpracování vzorků, laboratorní vyšetření, analýza dat, příprava a odeslání publikace.

Tato příloha obsahuje celkem 7 stran.



**11.1.2 K. Zemánková *et al.*, *Physiol Res.* (2015)**

Zemánková, K., Dembovská, R., Piňha, J., Kovář, J.

**Glucose added to a fat load suppress the postprandial triglyceridemia response in carriers of the -1131C and 56G variants of the *APOA5* gene.**

*Physiological research.* 2017, *accepted.*

IF 1,643 (2015).

Příspěvek:

Příprava a provedení studie u 30 dobrovolníků, zpracování vzorků, laboratorní vyšetření, analýza dat, příprava a odeslání publikace.

Tato příloha obsahuje celkem 18 stran.

**11.1.3 J. Kovář *et al.*, *Physiol Res.* (2015)**

Kovář, J., Zemánková, K.

**Moderate alcohol consumption and triglyceridemia.**

*Physiological research.* 2015, 64 (Suppl. 3), S371-S375. ISSN 0862-8408.

IF 1,643 (2015).

Příspěvek:

Literární rešerše, příprava a odeslání publikace.

Tato příloha obsahuje celkem 5 stran.

#### **11.1.4 K. Zemánková *et al.*, *Metabolism* (2015)**

Zemánková, K., Makoveichuk, E., Vlasáková, Z., Olivecrona, G., Kovář, J.

**Acute alcohol consumption downregulates lipoprotein lipase activity *in vivo*.**

*Metabolism: clinical and experimental*. 2015, 64(11), 1592-1596. ISSN 0026-0495.

IF 4,375 (2015).

Příspěvek:

Příprava a provedení studie u 8 dobrovolníků, zpracování vzorků, laboratorní vyšetření, analýza dat, příprava a odeslání publikace.

Tato publikace získala 2. cenu České společnosti pro aterosklerózu za nejlepší publikovanou původní práci za rok 2015/2016.

Tato příloha obsahuje 6 stran.

## **11.2 Publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace**

### **11.2.1 T. Blahová *et al.*, *Physiol Res* (2016)**

Blahová, T., Peterková, L., Leníček, M., Vlachová, M., Zemánková, K., Adámková, V., Vítek, L., Kovář, J.

**The effect of colessevelam treatment on bile acid and lipid metabolism and glycemic control in healthy men.**

*Physiological research*. 2016, 65:995-1003 . ISSN 0862-8408

IF 1,643 (2015).

Příspěvek:

Stanovení koncentrace celkového a aktivního GLP-1, genotypizace pacientů.

Tato příloha obsahuje 9 stran.